АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVIII. ВЫП. 4

ИЮЛЬ — АВГУСТ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1949

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ" ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

УЧЕНИЕ ВИЛЬЯМСА И ЗАДАЧИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

К. И. Рудаков

Несмотря на огромный интерес к почвенному перегною, несмотря на упорное и всестороннее изучение его, до сих пор нет единого взгляда на происхождение, химизм и значение перегноя в развитии почвенного плодородия. Нет даже единого определения самого понятия перегноя или гумуса. В самом деле, что представляют собой многочисленные данные о процентном содержании гумуса в почве? Как правило, они получены путем умножения количества углерода на условный коэффициент ($CO_2 \times 0{,}471$). При таком способе определения в общую цифру войдет углерод растительных и животных остатков и промежуточных продуктов их распада; углерод живых и мертвых телец почвенной микрофлоры и микрофауны и продуктов их жизнедеятельности; углерод органических веществ, не встречающихся в живой природе; углерод продуктов физико-химических изменений вышеперечисленных веществ, продуктов окисления и восстановления, полимеризации, уплотнения, взаимной конденсации и т. д.

Какие вещества из всего этого разнообразия считать гумусовыми веществами и какие относить к числу «прочих», не гумусовых органических веществ? Этот вопрос и по сей день остается открытым.

Причина в том, что в настоящее время нет способов разделения ни одной из перечисленных групп веществ. Можно лишь делать условно точные определения отдельных органических соединений или их групп, вне зависимости от их происхождения, или же прибегать к анализу неопределенных комплексов, извлеченных при помощи различных растворителей (спирт, бензин, эфир, растворы нейтральных солей, щелочей, кислот), причем нельзя быть уверенным в том, что нами получены вещества, действительно находящиеся в почве, а не продукты их взаимодействия с растворителем.

Уже в силу методических затруднений наши современные представления о гумусе, а тем более о его происхождении и роли в почве, весьма условны.

Основной причиной, затруднявшей решение проблемы гумуса, было то, что гумус изучался как таковой, как «вещь в себе». Это — методологическая ошибка. Надо отказаться от эмпирических анализов и поставить во всю широту изучение гумуса как «вещи для нас», т. е. как фактора почвенного плодородия.

Блестящее начало такому подходу к изучению гумуса положил В. Р. Вильямс, со всей присущей ему остротой мысли.

Он создал учение о почве и почвенном плодородии, учение, глубоко биологическое, в котором среди прочих факторов отводится огромная роль микроорганизмам.

Чем больше и глубже изучаешь труды Вильямса, тем все сильнее поражаешься его колоссальным знаниям в самых разнообразных отраслях науки, его исключительной эрудиции, его способности к широким обобщениям, дару научного предвидения. Создавая свое учение о почве, Вильямс широко пользовался данными геологии, физики, химии, физической и коллоидной химии, биологии, микробиологии, материалами

современной ему агрономической науки, лесоводства, ботаники и т. д., и т. д. Трудно указать ту науку, которой не затрагивает Вильямс в своих трудах.

В своих произведениях Вильямс редко приводит цифровые данные по тому или другому вопросу, редко цитирует авторов или ссылается на них. Он берет самое существо современной ему науки, полагая детали известными читателю, делает широчайшие обобщения, смело бросает вызов будущему, как бы предвидя ход дальнейшего развития науки. Нам не приходится проверять положения Вильямса: огромное большинство их подтверждено практикой, получило широкое признание. По его трудам мы должны учиться как строить научную работу, развивать те мысли, которые далеко опередили современность.

В настоящем сообщении мы не имеем в виду излагать учение Вильямса в целом. Мы ставим своей задачей отметить некоторые важные для агрономии вопросы, поставленные Вильямсом и требующие для своего разрешения участия сельскохозяйственной микробиологии. К числу таких вопросов относятся:

1) природа перегнойных веществ почвы; 2) условия образования активного перегноя и формирования прочных структурных агрегатов; 3) биологическое разрушение перегноя; 4) микроорганизмы и корневое питание растений.

Настоящая статья написана преимущественно в соответствии с положениями Вильямса, изложенными в его последнем произведении (1948). Страницы, обозначенные в тексте цифрами в скобках, относятся к этой книге.

Природа перегнойных веществ

Основной формой перегноя, определяющей собой плодородие почвы, Вильямс считает деятельный перегной, количество которого может достигать 1% от веса почвы. Происхождение и свойства деятельного перегноя, по Вильямсу, таковы: он образуется в анаэробных условиях, в результате деятельности анаэробных бактерий и представлен в основном ульминовой кислотой (а также ульмином и солями ульминовой кислоты). Гуминовая кислота — гумин, образуемые аэробными бактериями, могут накопляться в почве лишь в ничтожном количестве.

Ульминовая кислота, продуцируемая анаэробными бактериями, обладает высоким содержанием азота, сложным молекулярным строением и токсична в отношении бактерий, ее создающих. Исходя из этих признаков, Вильямс отождествляет ульминовую кислоту, а следовательно, и активный перегной с экзоэнзимами анаэробных бактерий. Ульминовая кислота выделяется бактериальной клеткой в молекулярнорастворимой форме, легко дает соли; освобождаясь тем или иным путем из солевой формы, переходит в хлопьевидный слизистый осадок — ульмин. Такая же модификация ульмина образуется при замораживании ульминовой кислоты.

Хлопьевидно-слизистая модификация ульмина под воздействием солей щелочных металлов в свою очередь может давать коллоидные солеобразные растворы, содержащие металлические ионы в поглощенном состоянии.

Если эти растворы в качестве поглощенных ионов содержат ионы щелочных металлов,— они обладают клеящими свойствами, но частицы почвы, пропитанные ими, легко распадаются под воздействием воды.

При замене же одновалентных катионов двухвалентными (кальцием), такие растворы переходят в состояние цемента и могут давать водопрочные почвенные агрегаты.

Образование ульминовой кислоты, по Вильямсу, происходит только в клетке анаэробных бактерий. В клетку проникают молекулярно-растворимые составные части растений — продукты, образующиеся под

влиянием ферментативного гидролиза отмерших растений, в том числе и азотистые, а также минеральные соединения азота. Из них внутри клеток и образуется ульминовая кислота, обладающая свойствами экзоферментов и выделяемая в молекулярнорастворимой форме во внешнюю среду.

Естественно возникает вопрос: в какой мере точка зрения Вильямса принята микробиологами и развита ими?

Микробиологи, как советские, так и зарубежные, включились в изучение проблемы образования перегнойных веществ сравнительно недавно. Нужно сказать, однако, что до самого последнего времени они мало уделяли внимания концепциям Вильямса. Грубо схематично можно отметить пять точек зрения, развиваемых микробиологами:

1. Гумус, точнее ядро гумуса, рассматривается как продукт взаимодействия видоизмененного лигнина с протеином (Fischer и Schrader 1921, 1922). На роль лигнина указывал еще Dehérain и Demussy (1896), а затем Wehmer (1915), Fuchs (1929—1931) и др.

Waksman и Iyer (1932—1933) выдвинули теорию лигно-протеинового комплекса, как ядра почвенного гумуса. По Ваксману и Айеру, основная масса гумуса составлена из продуктов конденсации между лигнином и его дериватами, с одной стороны, и протеином,— преимущественно микробного происхождения,— с другой. Искусственно приготовленные лигно-протеиновые комплексы (смеси щелочного раствора лигнина и протеина, осажденные кислотами, а также солями 2- и 3-валентных металлов) обладали всеми основными свойствами природного гумуса (точнее, «гуминовой кислоты», α-гумуса).

Взгляды, развиваемые Ваксманом, вызвали к себе значительный интерес, но признания не получили (ср. Тюрин, 1936).

Теория лигно-протеинового комплекса имеет мало общего со взглядами Вильямса, так как рассматривает образование перегноя как внеклеточный процесс конденсации лигнина и протеина.

2. Несколько менее популярна, но все же имеет в настоящее время значительное число сторонников целлюлозная теория происхождения гумуса, сформулированная в 1925—1927 гг. Marcusson (1925, 1926, 1927).

В настоящее время целлюлозную теорию развивает в СССР Кононова (1943, 1947, 1948). Она доказывает, что продукты, получающиеся при разложении клетчатки целлюлозными бактериями, окисляются при участии пероксидаз в соединения ароматического ряда (типа хинонов). Последние, конденсируясь с продуктами распада микробной плазмы — полипептидами, дают устойчивые комплексы, обладающие признаками гумусовых веществ.

3) Последним по времени следует считать взгляд, формулированный Рудаковым (1946, 1948), согласно которому гумусовые вещества, цементирующие почвенные комочки (т. е. активный гумус), образуются при комплексировании полиуронидов и микробного протеина (или продуктов его автолиза). Полиурониды, входящие в состав уронопротеидов, образуются при ферментативном распаде пектиновых веществ.

Особенность взгляда Рудакова сводится к тому, что образование активного перегноя он допускает не только при распаде растительных остатков, но в процессе развития корневых систем растения. Последние подвергаются воздействию бактерий, образующих протопектиназу. Идет разрушение межклетников корня (протопектина), при ферментативном распаде протопектина освобождаются полиурониды, которые, взаимодействуя с микробным протеином (или первичными продуктами автолиза микробной плазмы), образуют уронопротеиды, склеивающие, а затем цементирующие почвенные комочки.

4) К четвертому направлению можно отнести взгляды исследователей, считающих гумусовыми веществами микроорганизмы и продукты микробного синтеза. Этот взгляд впервые был высказан Костычевым

(1891). Впоследствии эта точка зрения в разной фроме развивалась Schreiner и Shorey (1910), а также другими американскими исследователями, в последнее время Martin (1945, 1946), который считает агрегирующим началом синтезированные бактериями полисахариды. Аналогичные взгляды были высказаны Виноградским (1929), Трусовым (1917), Сорокиной и Тягны-Рядно (1933), отчасти Мишустиным (1941—1942) и другими исследователями.

Гельцер (1940, 1945) рассматривает гумус как продукт бактериального синтеза (тельца бактерий и продукты их автолиза); основными материалами, за счет которых развивается синтетическая деятельность бактерий, являются, по Гельцер, в первую очередь белки, клетчатка, продукты автолиза грибов. Она рассматривает органическую массу, синтезированную бактериями, не как гумус вообще, но как деятельный перегной, способный цементировать почвенные агрегаты. Особое внимание Гельцер (1945) обращает на бактерии из ризосферы травосмесей, видя в них причину повышения прочности структуры почвы травяным полем.

Взгляды Гельцер были подвергнуты критике со стороны Мишустина и его сотрудников (1941, 1942, 1945, 1946), которые доказывают, что почвенные агрегаты, склеенные микробной массой, не обладают высокой, длительной прочностью. Следует заметить, однако, что ни Гельцер, ни Мишустин в своих исследованиях не приняли во внимание важнейшего положения Вильямса, согласно которому активный перегной, облекающий почвенные комочки, приобретает способность их цементировать или под влиянием кальция, или под влиянием зимнего промораживания. Поэтому вопрос о прочности почвенных частиц, приобретаемой за счет микробной массы, до сих пор остается открытым.

5) Своеобразную позицию в отношении природы гумуса занимает Мишустин (1947). Он полагает, что гумус может образовываться из самых различных природных растительных соединений. Эти соединения первоначально подвергаются ферментативному гидролизу (за счет действия микробных и растительных ферментов); продукты их распада в условиях пониженной микробной деятельности взаимно реагируют, превращаются в гуминовые вещества.

Мы должны отметить, что Вильямс не отрицает возможности образования перегнойных веществ за счет гидролитических процессов (стр. 298), но образовавшийся таким путем перегной он считает недеятельным.

Рассмотренные точки зрения до последнего времени были наиболее широко распространены в СССР. Они имеют много общего и объединены Тюриным (1937) следующим выражением: «Гумус является сложным комплексом, формирующимся в результате процессов окисления, полимеризации уплотнения или взаимной конденсацией растительных и животных органических веществ, а также вторичных продуктов, образовавшихся в результате жизнедеятельности микроорганизмов, продуктов распада и микробного синтеза».

Нужно прямо сказать, что все изложенные точки зрения расходятся с концепцией Вильямса, который подчеркивает, что гумус есть продукт внутриклеточного микробного синтеза. Все же перечисленные исследователи рассматривают гумус как продукт эктоцеллюлярного (ферментативного и чисто химического) синтеза.

Вильямс опубликовал свои положения до того, как были сформулированы современные взгляды на структуру ферментов.

Огромное большинство ферментов мы рассматриваем в настоящее время как комплекс белковой части (апофермента) и деятельной группы (кофермента); в отношении белковой части ферментов можно сказать лишь одно, что принципиальных отличий этого белка от обычных белков не констатировано. Что же касается активной группы, то она может

быть весьма различной по своей химической природе. В основном это или варианты гемина и его производные (гемоглобин, хлорофилл, пероксилаза, каталаза, дыхательный фермент Варбурга или же производные флавина с нуклеотидной группировкой, или дериваты витаминов B_1, B_2, С).

Изложенные выше современные представления о структуре перегнойных веществ (дериваты лигнина, целлюлозы, пектина в комплекс с протеином) в сущности не расходятся с нашими представлениями о структуре ферментов. Больше того, если будет показано, что синтез перегнойных комплексов происходит не внеклеточно, а внутриклеточно, то взгляды Вильямса перестанут быть гипотезой. Необходимо, конечно, посмотреть также, в какой мере перегнойные вещества обладают ферментативными свойствами. До сих пор подобным исследованиям никто не уделял внимания.

Существенной особенностью взглядов Вильямса является одно то, что в центре своего внимания, в отличие от других исследователей, он ставит не те или иные химические компоненты растительного остатка, за счет которых может образоваться перегной, а микробов, их ферментный комплекс.

Положительные результаты таких исследований могут повлечь за собой дальнейшее развитие идей Вильямса. Ведь совершенно очевидно, что, говоря об анаэробных бактериях, Вильямс имел в виду различных по видовому составу бактерий. Ясно, что продукты их жизнедеятельности, создаваемые ими ферменты также неодинаковы по своей химической структуре, хотя они и очень близки по своим физическим и коллоидным свойствам. Последнее и дало основание Вильямсу объединить различные по происхождению и химическим свойствам (но однородные по физическим и коллоидным свойствам) вещества в одну группу, в один комплекс — ульминовую кислоту. Таким образом, нам думается, что под термином ульминовая кислота мы будем иметь право понимать группу сложных соединений, построенных по типу ферментов, т. е. состоящих из коллоидной белковой части и активной части различного состава. Наша очередная задача поэтому выяснить, как формируются эти перегнойные соединения — внутриклеточно или же внеклеточно, и установить, за счет деятельности каких микробов произошли отдельные представители комплекса ульминовой кислоты, какова химическая природа их активных групп, а также в какой мере подобные вещества обладают ферментативными свойствами.

Условия образования активного перегноя

Величайшей заслугой Вильямса следует считать его указания на условия образования и разрушения перегнойных веществ. Его взгляды на условия образования и разрушения перегнойных веществ положены им в основу учения о травопольной системе земледелия и в настоящее время нашли полное практическое признание.

Как было сказано выше, основными типами перегнойных веществ, способными цементировать почвенные агрегаты, Вильямс считает две перегнойные кислоты: ульминовую и гуминовую. Первая образуется анаэробными бактериями и в условиях своего образования представляется весьма стойкой; под действием Са превращается в нерастворимую форму; под влиянием мороза денатурируется, превращаясь в ульмин. Ульминовая кислота разрушается аэробными бактериями и грибами.

Ульминовая кислота, по Вильямсу, является основным перегнойным веществом, придающим прочность почвенным комочкам.

Гуминовая кислота очень близка по своим свойствам к ульминовой. Продуцируется она аэробными бактериями и легко ими же разрушается.

Гуминовая кислота играет незначительную роль в формировании прочных структурных агрегатов, так как аэробные бактерии могут накопить лишь ничтожное количество гумина в почве; гумин сам служит превосходным субстратом для развития аэробных бактерий, которые и разрушают его.

В максимальном количестве в природных условиях ульминовая кислота накопляется при развитии луговой стадии дернового периода почвообразования (луговые травы, анаэробные бактерии, отчасти аэробные бактерии). Это определяется прежде всего особенностями многолетних трав. Они отмирают в начале зимы, осенью не разлагаются. Весной, при высокой влажности почвы, при низкой аэрации в почве, может протекать только анаэробный процесс, влекущий за собой накопление ульминовой кислоты. При травопольной системе земледелия условия, создаваемые луговой растительностью искусственно на травяном поле, создаются посевом смеси многолетних злаковых трав и многолетних бобовых. В почве под травяным полем идет интенсивное накопление ульминовой кислоты, формирование прочных структурных агрегатов.

Таковы положения Вильямса по вопросу об условиях формирования прочных структурных агрегатов. Практикой они восприняты; для микробиологов же вся работа впереди. Необходимо точно установить, какие же анаэробные бактерии образуют комплекс перегнойных веществ, объединяемый Вильямсом под именем ульминовой кислоты, какими путями можно форсировать их жизнедеятельность, ускорить процесс формирования прочных структурных агрегатов и тем самым уменьшить срок пребывания почвы под травяным полем, найти ту выраженность анаэробных условий (окислительно-восстановительный потенциал), которые обеспечивают лучшую деятельность анаэробных бактерий. Не менее важно вскрыть и самый механизм формирования комплекса ульминовой кислоты: за счет каких составных частей растения развивается деятельность анаэробных бактерий, продуцирующих ульминовую кислоту (это будет способствовать правильному подбору компонентов травосмеси для различных районов СССР); имеет ли место последовательная смена микробов на различных стадиях распада растительных остатков и как она осуществляется; каков удельный вес микроорганизмов ризосферы в формировании комплекса ульминовой кислоты; в какой мере комплекс ульминовой кислоты образуется за счет живущего и развивающегося растения и т. д.

Назначение травяного поля сводится, по Вильямсу, однако, не только к формированию прочных структурных агрегатов. Травяное поле призвано также обогатить почву элементами зольного и азотистого питания, а также известью как средством денатурации активного перегноя. Первая и последняя задача выполняется глубоко идущими корневыми системами бобового компонента травосмесей, извлекающими зольные вещества из глубоких слоев почвы и переносящими их в верхние горизонты. Обогащение же почвы азотом осуществляется азотусвояющей системой «бобовое растение — клубеньковые бактерии».

Повысить энергию усвоения элементарного азота этой системой — благодарная задача для сельскохозяйственных микробиологов. Этого можно достигнуть приемами агротехники, удобрениями, селекцией бобовых и т. п. С другой стороны, многого можно достигнуть активированием клубеньковых бактерий путем соответствующего воспитания, направленно приводящего к наследственным изменениям, к повышению энергии фиксации азота.

Разрушение активного перегноя

В любой почве, если она находится в сельскохозяйственной культуре, прочность структуры постепенно снижается вследствие разрушения

активного перегноя. Вильямс говорит о трех категориях причин разрушения структуры: 1) причины механические — обработка почвы, передвижение животных и людей; 2) причины физико-химические — вытеснение иона кальция ионом аммония из перегнойных веществ; 3) причины биологические — разрушение перегнойных веществ микроорганизмами.

Мы остановим наше внимание только на причинах биологических. «Нормальным состоянием элементов пищи в почве,— говорит Вильямс,— надо считать состояние мертвого органического вещества растительных остатков почвы и перегноя, равно как и живого органического вещества растений и бактерий». Однако для обеспечения нормального корневого питания растений необходимо, чтобы некоторая часть органического вещества минерализовалась в той мере, в какой это необходимо для полноценного питания сельскохозяйственных растений. Такая частичная, притом находящаяся в сочетании с потреблением растением влаги, минерализация происходит в структурной почве. Как известно, в анаэробных условиях минерализация органического вещества оказывается заторможенной; сохраняется (по Вильямсу) 50—75% органической массы. В аэробных же условиях минерализация очень быстро приходит к концу.

В структурной почве мы имеем одновременно наличие и аэробных и анаэробных условий.

«В структурной почве вода и усвояемая пища не бывают антагонистами». «Условия аэробиозиса и анаэробиозиса как бы взаимно проникают друг друга, составляя две непрерывно развитые во всех направлениях цепи, звенья которой обоюдно проникают в просветы каждой». На поверхности каждого комка идет аэробный процесс, а внутри — анаэробный. Такое гармоническое сочетание противоположных по эффекту процессов обеспечивает и нормальное разложение растительных остатков, отвечающее потребностям растений в элементах корневого питания, и одновременно максимальное сохранение зольных элементов в органической форме. При аэробном процессе одновременно с растительными остатками частично минерализуется и деятельный перегной и, следовательно, разрушается прочная структура почвы.

Для сохранения прочной структуры кажется естественным обеспечить нормальное питание растений внесением минеральных удобрений и тем самым сохранить в неприкосновенности органическое вещество почвы. Однако этот путь, как показывает Вильямс, только кажется эффективным.

«При внесении одних минеральных удобрений микрофлора почвы усиленно потребляет эти удобрения и, как гетеротрофная, для усвоения элементов пищи усиленно разрушает перегнойные вещества почвы» (Вильямс).

Кроме того, огромная доля внесенных минеральных удобрений переходит «в органические формы живой микрофлоры, которая при быстром размножении передает эти элементы из поколения в поколение».

Возможным средством замедлить распад прочноструктурных агрегатов при внесении минеральных удобрений и одновременно средством обеспечить полноценное использование растением этих удобрений является одновременное с минеральными внесение органических удобрений (навоз, торф). В этом случае... «вся доза минеральных удобрений остается в распоряжении зеленых растений, которые вместе с тем пользуются и элементами пищи, освобождающимися после разложения как навоза, так и тел самих бактерий».

Изложенные в этом разделе взгляды Вильямса ставят много крупных вопросов перед микробиологами. Уже один вопрос о биологическом разложении прочноструктурных элементов почвы заслуживает самого пристального внимания. Нужно сказать, что по данному вопросу мы

до сих пор имеем лишь отдельные исследования, не давшие определенных результатов (Никитинский, 1902; Виноградский, 1929).

Нам неизвестны ни микроорганизмы, разлагающие активный перегной, ни условия его разложения. Между тем такие исследования должны оказать большое влияние на развитие агротехники. Особенно важными представляются исследования о влиянии минеральных удобрений на разложение активного перегноя и одновременно о влиянии органических удобрений.

Еще меньше материалов мы до сих пор имеем по вопросу о биологическом поглощении минеральных удобрений. Собственно говоря, имеем лишь одну небольшую, основанную на экспериментальных данных работу Красильникова (1944), а также статью Тюрина (1946).

Между тем агрономы и агрохимики говорят о далеко не полноценном использовании минеральных удобрений, относя это за счет биологического поглощения. В какой мере (в различных условиях) и в каком объеме происходит биологическое поглощение, в какой мере неполноценное использование минеральных удобрений следует отнести за счет физико-химических причин,— должны решить совместной коллективной работой микробиологи, агрохимики и почвоведы.

Микроорганизмы и корневое питание растений

Вильямс уделяет роли микроорганизмов в регулировании корневого питания растений огромное внимание.

Его отношение к роли микроорганизмов в корневом питании растений хорошо характеризуется следующими двумя его фразами: «При этом нельзя забывать, что кроме высших растений, необходимость питания которых совершенно очевидна, почвы заключают в себе мириады микроорганизмов, полезная роль которых находится вне сомнений.— Мы обязаны также питать и эти микроорганизмы высших растений» (стр. 290).

И в этом случае Вильямс подчеркивает, что микроорганизмы гетеротрофны и потому для их питания необходимо одновременное внесение и органических и минеральных удобрений.

Мы должны несколько подробнее остановиться на том смысле, которое вкладывает Вильямс в понятие «гетеротрофное питание».

Гетеротрофными Вильямс считает организмы, неспособные к поглощению солнечной энергии, организмы, получающие энергию при расщеплении органического вещества. В процессе расщепления органического вещества гетеротрофные организмы получают и пищу, причем этот способ питания не исключает способности усваивать элементы пищи (в том числе и азота) из минеральных соединений.

Гетеротрофные организмы способны синтезировать белки из углеводов, с одной стороны, и минеральных и органических азотистых веществ, с другой (стр. 252).

Самым существенным у Вильямса является следующее положение: «Способностью преобразовывать термическую энергию углевода, при наличии источника связанного азота в динамическую энергию белка обладают только незеленые низшие организмы, грибы, актиномицеты, бактерии и, повидимому, простейшие (протозоа)».

Исходя из этой позиции, Вильямс придает исключительное значение микотрофному и бактериотрофному питанию высших растений. Вильямс считает, что свыше девяти десятых флоры земной суши обладают микотрофным типом питания. Точно так же он признает широко развитым бактериотрофный тип питания («развитие специфической аэробной бактериальной флоры в ризосфере высших растений, в анаэробной среде») (стр. 253).

Микотрофное и бактериотрофное питание растений осуществляется

вследствие установления симбиотических отношений между высшими растениями, с одной стороны, и грибом или бактериями, с другой. Симбиоз между высшими растениями и грибами, а также бактериями заключается в том, что первые доставляют аэробным микроорганизмам через родство своей аэренхимы кислород; последние же в той или иной степени внедряются в корневую систему растений и, потребляя органическое вещество растения, обеспечивают необходимыми питательными веществами растение.

Особенно интересна точка зрения Вильямса на бактериотрофное питание растений. В его осуществлении, при наличии анаэробных условий, принимают аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии. Их деятельность так же, как и деятельность микоризных грибов, осуществляется за счет кислорода, добавляемого аэренхимой растений.

Вильямс жестоко обрушивается на «учение о минеральном питании растений», представители которого грубо механистически полагают, что минеральное (и азотистое) питание растений происходит по типу гетеротрофизма (стр. 254). (Напоминаем еще раз, что гетеротрофным типом питания, по Вильямсу, обладают только незеленые низшие организмы).

Этот вопрос о колоссальной роли грибов, бактерий и других низших растений в обеспечении высших растений белком, источником динамической энергии до сих пор не стал предметом пристального внимания микробиологов и физиологов растений.

Вопрос о важности решения этой проблемы еще в 1946 г. поставлен Лысенко; однако до сих пор мы имеем лишь весьма скромные попытки в этом направлении.

Знаменательно также замечание Вильямса о том, что при недостаточном питании микроорганизмы «становятся антагонистами высших растений». Очевидно, что Вильямс понимает под термином антагонизм не только межвидовую конкуренцию за питательные вещества между высшими растениями и микроорганизмами, но и возможность их перехода к паратрофному питанию, к паразитизму. Уже этот, весьма неполный перечень задач, вытекающих для микробиологов из учения Вильямса, настолько важен, что задержка их решения может отрицательно отразиться на развивающемся сельском хозяйстве СССР. Настало время вплотную подойти к учению Вильямса, овладеть им и обеспечить дальнейшее плодотворное его развитие.

Всесоюзный институт
сельскохозяйственной микробиологии
Москва

Получено 21. II. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильямс В. Р. Почвоведение. М., 1948.
2. Гельцер Ф. Ю. Что такое перегной? Почвоведение, 4, 52, 1940.
3. Гельцер Ф. Ю. Значение микроорганизмов в образовании перегноя и прочность структуры почвы. Сельхозгиз, 1940.
4. Гельцер Ф. Ю. Влияние бактеризации трав на урожай трав и на накопление прочной структуры почвы. Почвоведение, 8, 421, 1945.
5. Кононова М. М. Применение микроскопического метода при изучении вопроса о происхождении гумусовых веществ. Почвоведение, 6, 27, 1943.
6. Кононова М. М. Основные итоги исследований в области почвенного гумуса в СССР за 30 лет. Почвоведение, 12, 1947.
7. Костычев П. А. Образование и свойства перегноя. Тр. Сибирск. о-ва естествоиспытателей, 20, 193, 1891.
8. Красильников Н. А., Бактериальная масса ризосферы растений. Микробиология, XIII, 144, 1944.
9. Лысенко Т. Д. Сельскохозяйственная наука в борьбе за выполнение Сталинской программы. «Известия», № 56 (6 марта), 1946.
10. Мишустин Е. Н. Роль микробиологического фактора в образовании почвенной структуры. Микробиология, X, 342, 1941.
11. Мишустин Е. Н. и Пушкинская О. И. Роль микробиологического фактора в образовании почвенной структуры. Микробиология, XI, 342, 1942.

12. Мишустин Е. Н. Лабильная часть почвенной макроструктуры. Почвоведение, 2, 122, 1945.
13. Мишустин Е. Н. Прочность создаваемых микроорганизмами макроагрегатов почвы. Микробиология, XV, 169, 1946.
14. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. М.—Л., 1947.
15. Никитинский Я. Я. О разложении гуминовой кислоты. Jahrbuch wiss Botanik. 1902.
16. Сорокина А. В. и Тягны-Рядно М. Г., К вопросу о роли микроорганизмов в образовании гумуса. Микробиология, XI, 285, 1933.
17. Трусов А. Г. Материалы к изучению почвенного гумуса, ч. 1, 1917.
18. Тюрин И. В. Органическое вещество почвы, 1937.
19. Тюрин И. В. О количественном участии живого вещества в составе органической части почв. Почвоведение, 1, 1, 1946.
20. Dehérain P. P. Traité de chimie agricole, ed. 2, Paris, 1902.
21. Fischer F. u. Schrader H. Über die Entstehung und die chemische Struktur der Kohle. Brennstoffchem., 2, 37, 1921; 3, 65, 341, 1922.
22. Fuchs W. Über die Beziehung zwischen Huminsäure und Lignin, Brennstoffchemie, 9, 298, 1928.
23. Fuchs W. Über die Beziehung zwischen Huminsäure und Lignin, Brennstoffchemie, 10, 303, 1929.
24. Fuchs W. Über die Beziehung zwischen Huminsäure und Lignin, Brennstoffchemie, 12, 266, 1931.
25. Marcusson I., Struktur und Bildung der Huminsäuren und Kohlen. Ber. Deut. Chem. Ges., 58, 869, 1925.
26. Marcusson I., Lignin und Oxycellulosetheorie. Z. angew. Chem., 39, 398, 1926.
27. Marcusson I. Lignin und Oxycellulosetheorie. Z. angew. Chem., 40, 48, 1927.
28. Martin J. Microorganisms and Soil aggregation. I. Origin and nature of some of the aggregating substances, 1945.
29. Martin J. Microorganisms and Soil aggregation: II. Influence of bacterial polysaccharides on soil structure. Soil Sci., 61 (2), 157, 1946.
30. Schreiner O. a. Shorey E. Chemical nature of soil organic matter. U. S. Dept. Agr. Bur. Soils. Bull., 74, 1910.
31. Waksman S. a. Iyer K. Synthesis of a humus-nucleus, an important constituent of humus in soils, peats, and composts. Soil. Sci., 34, 43, 71, 1932.
32. Waksman S. a. Iyer K. Synthesis of a humus-nucleus, an important constituent of humus in soils, peats and composts. Soil Sci., 36, 57, 69, 1933.
33. Wehmer C., Zum Abbau der Holzsubstanz durch Pilze. Ber. Deutsch. Chem. Ges., 48, 130, 1915.

ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АЗОТОБАКТЕРОМ В ПРИСУТСТВИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ И ВОДООТНИМАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

М. В. Федоров

В нашем предыдущем сообщении [5] приводились экспериментальные данные о высокой чувствительности процесса фиксации молекулярного азота азотобактером к поверхностно-активным веществам. В настоящей работе приводятся дополнительные данные о влиянии подобного типа веществ на ход этого процесса. Все нижеописываемые опыты проводились с культурами Azotobacter agile на безазотной питательной среде (наша модификация) с инвертным сахаром в качестве источника углерода. Опыты велись в колбах Эрленмейера объемом на 300 мл. В каждую колбу наливалось 100 мл питательной среды (исходное pH около 7,0) с 1,8 г инвертного сахара (0,1 моля). В зависимости от химических особенностей поверхностно-активных веществ они добавлялись в среду или после стерилизации (спирты и ацетон), или до стерилизации (натриевые соли органических кислот). Стерилизация среды осуществлялась в автоклаве при 0,5 атмосферы давления пара в течение 20—30 минут. Колбы инфицировались 1 мл суспензии Azotob. agile, приготовлявшейся путем смыва в стерильную водопроводную воду агаровой культуры этого организма. После инфекции колбы выдерживались от 14 до 28 дней в термостате при 30°, и в них производились определения общего азота по Кьельдалю и остаточного сахара по Бертрану.

Первая серия опытов была поставлена с пропиловым, бутиловым и амиловым спиртами. Как известно, эти соединения могут блокировать в протоплазме живой клетки различные ферментные системы, вытесняя с их поверхности вещества, участвующие в каталитической реакции. Насонов и Александров [3, 4] экспериментально показали, что адсорбционную блокаду внутриклеточных поверхностей можно даже непосредственно наблюдать, применяя в качестве индикаторов различные краски. В ходе этих исследований выяснилось, что поверхностно-активные вещества блокируют пограничные поверхности, возникающие между активной группой и коллоидным носителем фермента. Их блокирующее действие весьма легко осуществляется и не зависит от того, будет ли коллоидный носитель иметь белковую или липоидную природу. Так как нами [11] было уже ранее установлено, что катализатор азотфиксации связан в своей работе с белком в качестве коллоидного носителя, то предположение о возможной блокировке спиртами пограничной поверхности между белком и активной группой катализатора и вытеснение с нее реагирующих веществ представлялось весьма вероятным. Приводимый ниже экспериментальный материал уточняет эти положения и, кроме того, показывает, что влияние поверхностно-активных веществ не ограничивается только вытеснением компонентов реакции, но затрагивает и состояние коллоидного носителя.

В опытах с высокомолекулярными спиртами мы пользовались малыми концентрациями их, не затрагивающими продуктивности использования сахара, но явно тормозящими фиксацию азота атмосферы. Полученные при этих опытах результаты приведены в табл. 1, 2 и 3.

Таблица 1

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile нормального и изо-пропилового спиртов

Концентрация спирта в среде в молях	Использование сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксирование азота атмосферы в мг за вычетом фиксации на одном спирте			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г. сахара в среднем	на 1 г мольгексозы	
0,00	1,70 1,70	100,0	11,40 11,50	11,45	2 061,0	100,0
Нормальный пропиловый спирт						
0,001	1,70 1,70	100,0	11,53 11,41	11,47	2 064,6	100,2
0,005	1,70 1,70	100,0	10,92 10,80	10,86	1 954,8	94,8
0,010	1,70 1,70	100,0	11,44 11,58	11,51	2 071,8	100,5
0,050	1,65 1,50	92,7	11,26 11,63	11,45	2 061,0	100,0
0,100	1,55 1,40	87,0	10,26 9,57	9,92	1 785,6	87,0
0,200	0,60 1,55	63,2	4,03 6,17	5,10	918,0	44,7
Изопропиловый спирт						
0,001	1,65 1,75	100,0	11,12 11,36	11,24	2 015,2	98,1
0,005	1,70 1,70	100,0	11,78 11,37	11,58	2 084,4	101,1
0,010	1,70 1,70	100,0	11,87 11,46	11,66	2 098,8	101,8
0,050	1,65 0,90	75,0	10,16 9,36	9,76	1 756,8	84,9
0,100	1,45 1,70	92,6	8,04 9,12	8,58	1 544,4	75,0
0,200	1,55 1,40	86,8	7,01 6,18	6,59	1 186,2	57,4

Аналогичные результаты были получены и с бутиловым спиртом, что легко установить из данных табл. 2.

Наиболее сильное влияние оказал изо-бутиловый спирт. При 0,05 моля этого вещества в среде фиксация атмосферного азота отвечала только 42,6% от контроля, в то время, как дыхание держалось еще на уровне 98,6%. В отличие от него нормальный бутиловый спирт оказался менее активным. Такой результат мог получиться потому, что нормальный бутиловый спирт, повидимому, частично используется азотобактером в качестве источника углерода.

Весьма близкий результат был получен и с амиловым спиртом, что легко выясняется из данных табл. 3.

Влияние амилового спирта оказалось аналогичным с влиянием нормального бутилового спирта и несколько отличным от изо-бутилового, но общий характер воздействия испытывавшихся спиртов остается одним и тем же.

При незначительных концентрациях этих соединений в среде и при 15-дневной продолжительности опыта они не оказывали угнетающего

Таблица 2

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile нормального и изо-бутилового спиртов

Концентрация спирта в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации атмосферного азота в % от контроля
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г моль гексозы	
0,000	1,70 1,70	100,0	11,40 11,50	11,45	2 061,0	100,0
I. Изо-бутиловый спирт						
0,001	1,80 1,80	105,9	11,86 10,72	11,29	2 032,2	98,6
0,005	1,80 1,80	105,9	11,55 8,21	9,88	1 778,4	86,3
0,010	1,70 1,70	100,0	8,03 10,21	9,12	1 641,6	79,8
0,050	1,70 1,65	98,6	4,12 5,63	4,88	878,4	42,6
0,100	1,60 1,55	92,6	3,94 3,48	3,71	667,8	32,4
II. Нормальный бутиловый спирт						
0,010	1,70 1,70	100,0	10,69 10,58	10,64	1 915,2	92,9
0,050	1,65 1,60	95,6	11,65 9,42	10,53	1 875,4	91,9
0,100	1,60 1,70	97,1	6,36 5,95	6,16	1 108,8	53,9

влияния на использование сахара. Во всех вариантах опыта сахар почти полностью использован. И, несмотря на это, фиксация атмосферного азота в присутствии спиртов оказалась ниже контроля, и, чем выше был молекулярный вес использованного спирта, тем сильнее он подавлял фиксацию. Из этих данных с определенностью следует, что фиксация молекулярного азота азотобактером действительно чувствительна к поверхностно-активным веществам, блокирующим в протоплазме клетки какую-то каталитическую поверхность, участвующую в осуществлении данного процесса. Поэтому может стоять только вопрос о возможности количественной оценки размеров этой каталитической поверхности.

Мы в ранее опубликованной работе [5], исходя из того, что разные спирты по-разному адсорбируются каталитической поверхностью клетки и могут иметь разные площади сечения молекул (вместе с промежутками между ними) рассчитали по эмпирической формуле Коппа приблизительные размеры активной поверхности катализатора азотфиксации. Наш расчет вызвал возражение со стороны Гапона, который указывает, что Коппом даны молекулярные объемы только для температуры кипения вещества, а в нашем случае опыты производились при 30° [1].

На первый взгляд такое возражение кажется весьма существенным, однако оно не отвечает действительности и не снижает ценности нашего расчета. В этом легко убедиться, ознакомившись со следующим положением физической химии [5]: «Способ рассмотрения Коппа оказывается удачен в двух отношениях. Во-первых, само сравнение объемов допустимо ввиду того, что при температуре кипения различные вещества

Таблица 3

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile нормального и изо-амилового спиртов

Концентрация амилового спирта в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г моль гексозы	
0,00	1,80 1,80	100,0	13,61 13,61	13,61	2449,8	100,0
I. Изо-амиловый спирт						
0,01	1,80 1,80	100,0	12,10 12,29	12,20	2196,0	90,6
0,05	1,80 1,80	100,0	8,87 8,16	8,52	1533,6	62,6
II. Нормальный амиловый спирт						
0,00	1,70 1,70	100,0	11,40 11,50	11,45	2061,0	100,0
0,001	1,70 1,55	95,6	11,37 11,90	11,64	2095,2	101,6
0,005	1,70 1,60	97,2	11,73 10,62	11,17	2010,6	97,6
0,010	1,65 1,65	97,2	10,27 10,05	10,16	1828,8	88,7
0,050	1,65 1,60	95,6	10,10 7,90	9,00	1620,0	78,6

действительно находятся (согласно Гульдбергу) в соответственных состояниях. Во-вторых, сравнимы и сами рассматриваемые объемы, которые представляют собою равные кратные истинных молекулярных объемов... В точке кипения молекулы жидкости сжаты плотнее, но в одинаковой степени для различных веществ» (стр. 211—212). Если к этому добавить, что формула Коппа учитывает не только объемы молекулы, но и промежутки между ними, то использованное нами в предыдущей работе сравнение не только возможно, но и закономерно. Но так как при такого рода расчетах получаются весьма значительные размеры каталитической поверхности, участвующей в азотфиксации, то нет сомнений в том, что они носят сугубо ориентировочный характер. Это положение с неизбежностью следует из того очевидного факта, что главное значение в угнетении процесса азотфиксации спиртами связано с разницей их адсорбции каталитической поверхностью клетки, а не только разницей в размерах их молекул. Даже при одинаковой площади поперечного сечения молекул будет получаться примерно тот же результат при той разнице в адсорбции спиртов, которая была констатирована в опыте. В нашем расчете площадь сечения молекул изоамилового спирта, вычисленная по формуле Коппа, соответствовала 45,3 Å, а Ленгмюром для мирицилового спирта дается величина равная 27 Å. Столь значительное расхождение, вероятно, получилось потому, что по Коппу учитывается не только размер самих молекул, но и промежутки между ними. А для целей нашего расчета это весьма важное обстоятельство. Поэтому в нашем расчете и были приняты данные Коппа, а не данные Ленгмюра, хотя последние были хорошо известны нам. Но если даже принять поперечное сечение этих моле-

кул в 27 Å и учесть в два раза меньшую адсорбцию изо-бутилового спирта по сравнению с изо-амиловым, мы получим примерно тот же порядок величин, какой указывался в нашей работе (Федоров [11]).

В отличие от высокомолекулярных спиртов, метиловый и этиловый спирты не оказали угнетающего воздействия на фиксацию азота, что легко установить из данных табл. 4.

Таблица 4

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile метилового и этилового спиртов

Концентрация метилового спирта в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг (за вычетом фиксации на спиртах)			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г моль гексозы	
0,000	1,80 1,80	100,0	13,61 13,61	13,61	2449,8	100,0
I. Метиловый спирт						
0,010	1,80 1,80	100,0	13,26 12,06	12,66	2278,8	93,0
0,100	1,80 1,80	100,0	14,15 12,77	13,46	2422,8	98,9
0,200	1,80 1,80	100,0	13,07 14,10	13,58	2444,4	99,8
0,400	1,80 1,80	100,0	13,22 14,11	13,66	2458,8	100,4
II. Этиловый спирт						
0,01	1,80 1,80	100,0	12,66 14,22	13,44	2419,2	98,8
0,05	1,80 1,80	100,0	15,22 16,00	15,61	2809,8	114,8
0,10	1,80 1,80	100,0	16,11 14,81	15,46	2782,8	113,7
0,20	1,80 1,80	100,0	15,93 16,34	16,14	2905,2	118,7
0,40	1,50 1,45	81,9	15,46 15,40	15,43	2777,4	113,4

Результаты этого опыта дают основание полагать, что метиловый и этиловый спирты даже в сравнительно высоких дозах (0,4 моля) не оказывают угнетающего влияния на фиксацию молекулярного азота азотобактером. Такое влияние низкомолекулярных спиртов можно объяснить, повидимому, тем, что они быстро подвергаются окислению в клетках азотобактера и превращаются в соответствующие органические кислоты, используемые далее в качестве источников углерода. Вероятно поэтому наркотические свойства их так быстро и теряются. Кроме этой причины, могут быть, конечно, и другие. Косвенным подтверждением такой возможности могут служить данные по влиянию на азотфиксацию органических кислот, взятых в опыт в готовом виде. Небольшое тормозящее влияние они все же оказывают, а соответствующие им спирты не оказывают влияния на данный процесс. Особенно заметное влияние оказывают органические кислоты, не используемые азотобактером в качестве источника углерода или же используемые им сравнительно медленно (валериановая кислота), что легко устанавливается из данных табл. 5.

Таблица 5

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile кислот жирного ряда (натриевые соли)

Концентрация кислоты в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			всего в культуре	за вычетом фиксации на кислоте	на 1 г сахара в среднем	
0,00	1,80 1,80	100,0	24,85 24,82	24,85 24,82	13,80	100,0
I. Муравьиная кислота						
0,01	1,80 1,80	100,0	24,18 24,18	24,18 24,18	13,43	97,3
0,05	1,80 1,80	100,0	25,20 23,71	25,20 23,71	13,58	98,4
0,10	1,80 1,80	100,0	26,18 24,14	26,18 24,14	13,97	101,2
0,20	1,80 1,80	100,0	23,80 23,18	23,80 23,18	13,05	97,4
II. Уксусная кислота						
0,01	1,80 1,80	100,0	23,98 25,20	23,72 24,94	13,52	98,0
0,05	1,80 1,80	100,0	23,87 24,14	22,54 22,81	12,60	91,3
0,10	1,80 1,80	100,0	24,42 24,75	24,76 22,09	13,02	94,4
0,20	1,80 1,80	100,0	28,90 26,44	23,58 21,12	12,42	90,0
III. Масляная кислота						
0,01	1,80 1,80	100,0	23,94 25,12	22,89 24,17	13,08	94,7
0,05	1,80 1,80	100,0	28,79 29,82	23,53 25,06	13,50	97,8
0,10	1,70 1,70	94,5	32,47 32,83	22,95 23,31	12,85	93,1
IV. Валериановая кислота						
0,01	1,80 1,80	100,0	25,20 26,18	24,20 26,18	14,27	103,4
0,05	1,80 1,80	100,0	20,06 20,61	20,06 20,61	11,30	81,9
0,10	1,70 1,80	97,2	21,28 21,10	21,28 21,10	12,11	87,8

Муравьиная кислота оказалась малоэффективной, уксусная и масляная кислоты дали понижение интенсивности азотфиксации в пределах 10%, а валериановая кислота — в пределах 20%. В последнем случае угнетающее влияние превосходит предел погрешности опыта и может считаться доказанным. Из этого следует, что органические кислоты, обладающие ясно выраженной поверхностной активностью, также немного понижают продуктивность азотфиксации. Видимо, ферментный аппарат, обслуживающий данный процесс, действительно имеет пограничные поверхности, частично блокируемые этими веществами. Не составляет из этого правила исключения и ацетон. При концентрации в 0,05 моля и 0,1 моля он также понижает интенсивность азотфиксации примерно на

5—6%, а при концентрации 0,2 моля — даже на 13,4%, что легко выясняется из данных табл. 6.

Таблица 6

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile ацетона

Концентрация ацетона в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г моль-гексозы	
0,000	1,70 1,70	100,0	11,40 11,50	11,45	2 061,0	100,0
0,001	1,70 1,70	100,0	11,53 11,98	11,75	2 115,0	102,6
0,005	1,80 1,80	105,9	10,46 10,93	10,70	1 926,0	93,5
0,010	1,70 1,70	100,0	11,88 10,62	11,30	2 034,0	98,7
0,050	1,70 1,70	100,0	10,64 10,98	10,81	1 945,8	94,4
0,100	1,70 1,70	100,0	11,06 11,02	11,05	1 989,0	96,5
0,20	1,35 0,90	69,2	10,53 9,31	9,92	1 795,6	86,6

Аналогичное влияние оказывают и повышенные дозы хлористого натрия. Это вещество было использовано нами в качестве обезвоживающегося средства, денатурирующего плазменные коллоиды.

Таблица 7

Влияние на интенсивность фиксации азота атмосферы Azotob. agile повышенных доз хлористого натрия

Концентрация хлористого натрия в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г моль гексозы	
0,00	1,80 1,80	100,0	14,16 14,02	14,09	2 536,2	100,0
0,10	1,80 1,80	100,0	13,26 14,07	13,67	2 460,6	97,0
0,20	1,80 1,80	100,0	14,54 15,10	14,77	2 658,6	104,9
0,40	1,80 1,80	100,0	13,82 13,60	13,71	2 467,8	97,2
0,80	Развития нет					

Как можно установить из этих цифр, концентрация хлористого натрия до 0,4 моля (2,32%) не сказывается на развитии азотобактера. Как потребление сахара, так и фиксация азота атмосферы держатся на уровне 100%. Но при дальнейшем повышении концентрации до 4,64% (0,8 моля) развитие полностью прекращается. Повидимому, при данной концентрации этого вещества в среде денатурация плазменных коллоидов, вызванная потерей воды, достигает такого размера, при котором

дальнейшее участие их в ходе важнейших физиологических процессов в клетке становится невозможным. Так как наиболее чувствительным физиологическим аппаратом является ферментный аппарат, обслуживающий азотфиксацию, то следует думать, что при частичном обезвоживании клетки он в первую очередь и выбывает из строя. Однако приведенные данные пока еще недостаточны для полного решения этого вопроса.

В связи с тем, что все вышеописанные опыты определенно указывают на угнетающее влияние поверхностно-активных веществ на фиксацию азота атмосферы азотобактером, возникает необходимость сопоставить их поверхностную активность с продуктивностью азотофиксации при наличии в среде этих соединений. Такое сопоставление, конечно, не будет устанавливать истинной зависимости, так как в протоплазме клетки наиболее важное значение имеют поверхностные натяжения на границе водной фазы и коллоидной мицеллы, а не на границе вода — воздух. Однако за неимением данных, характеризующих явления первого типа, приходится ограничиваться хотя бы данными второго типа. Эти сопоставления приведены в табл. 8.

Таблица 8

Поверхностная активность веществ и их угнетающее влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile

Название поверхностно-активных веществ	Поверхностное натяжение в дин/см для 0,25 молярн. раствора	Относительная поверхностная активность по сравнению с водой в %	Угнетение процесса фиксации азота атмосферы в % при концентрации 0,1 моля
Вода	71,6—73,0	100,0	0,0
Метиловый спирт	69,2	105,5	1,1
Этиловый спирт	66,0	110,6	0,0
Пропиловый спирт	57,7	126,5	23,3
Изо-бутиловый спирт	44,1	165,5	45,7
Изо-амиловый спирт	29,9	244,2	67,4
Муравьиная кислота	71,6	101,9	1,6
Уксусная кислота	66,8	109,3	5,6
Пропионовая кислота	60,1	121,4	5,9
Изо-масляная кислота	47,3	154,3	6,9
Изо-валериановая кислота	35,0	208,6	12,2
Ацетон	63,6	114,8	3,5

Сопоставление этих цифр не оставляет сомнений в том, что по мере возрастания поверхностной активности веществ их угнетающее влияние на азотфиксацию все больше и больше возрастает. Особенно ясный параллелизм намечается для спиртов, хотя и их относительное угнетающее воздействие падает при переходе от веществ с меньшей поверхностной активностью. Так, например, бутиловый спирт относительно больше подавляет азотфиксацию, чем амиловый спирт, а пропиловый относительно больше, чем бутиловый.

Еще менее эффективным оказывается влияние на азотфиксацию кислот жирного ряда. Если изо-амиловый спирт понижает фиксацию атмосферного азота на 67,4%, то валериановая кислота при той же концентрации дает понижение только на 12,2%, т. е. примерно в 5 раз меньше. Столь резкое расхождение в физиологической активности этих веществ, вероятно, связано с тем, что валериановая кислота была взята в форме натриевой соли, а натриевые соли, как известно, гораздо менее активны, чем свободные жирные кислоты.

Все эти данные неизбежно приводят нас к заключению, что природа угнетающего действия поверхностно-активных веществ связана или с

вытеснением ими из пограничных поверхностей ферментов тех веществ, взаимодействие между которыми катализируется данным ферментом, или же с нарушением связи между активной группой фермента и его коллоидным носителем. О последней возможности говорят, между прочим, данные по парализующему влиянию высоких доз хлористого натрия. Эта соль, конечно, не может вызвать блокады пограничного слоя, но, отнимая воду, она меняет устойчивость состояния коллоидного носителя и инактивирует фермент. Поэтому следует думать, что в основе угнетающего действия поверхностно-активных веществ лежат, по крайней мере, три причины: 1) вытеснение с пограничных поверхностей фермента реагирующих веществ, 2) изменение состояния коллоидного носителя и 3) изменение его связи с активной группой.

Каков удельный вес каждой из этих причин, мы не можем сейчас разрешить полностью, так как пока нет еще методической возможности разграничить эти факторы в системе живой протоплазмы клетки. А отсюда следует, что попытки подойти к абсолютным величинам при оценке активной поверхности фермента, участвующей в фиксации азота атмосферы азотобактером, пока еще преждевременны и по необходимости должны ограничиваться только теми приблизительными расчетами, которые были приведены нами в предыдущем сообщении.

Для более точных расчетов нужны данные об истинной адсорбции спиртов этой каталитической поверхностью клетки и разграничение их влияния на адсорбцию компонентов реакции и на степень связи коллоидного носителя фермента с его активной группой. Так как пока нет приемов для определения истинного значения этих величин, то не может быть и точной оценки размеров активной поверхности фермента, участвующего в процессе фиксации молекулярного азота. Но если мы не сможем определить истинные размеры каталитической поверхности клетки, то от этого нисколько не уменьшается значение факта, что поверхностно-активные вещества оказывают большее влияние на азотфиксацию по сравнению с дыханием. А этот факт бесспорно показывает нам, что оба эти процесса совершаются при участии различных каталитических агентов. Поэтому утверждение Гапона [1], что «вывод Федорова о существовании отдельных каталитического аппарата азотфиксации и каталитического аппарата дыхания не вытекает из его же экспериментальных данных» лишено основания. Правильность нашего вывода подтверждается не только данными по влиянию на азотфиксацию спиртов, но и по влиянию других блокирующих веществ, испытанных нами в ходе многочисленных исследований, изложенных в ряде наших работ, опубликованных за последние 5 лет [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Результаты, получающиеся при использовании разных блокирующих веществ, в том числе и таких, которые почти вдвое повышают продуктивность азотфиксации (молибденовая, фосфорно-молибденовая, борная и тимонуклеиновая кислоты и т. д.) позволяют легко убедиться в том, что дыхание и азотфиксация по-разному реагируют на наличие в среде блокирующих веществ, и поэтому они должны осуществляться при помощи различных ферментных механизмов.

Правильность этого положения может быть дополнительно подтверждена еще и данными по влиянию на дыхание и азотфиксацию щавелевой кислоты. Блокирующие свойства этого вещества были открыты нами случайно при попытках выращивания азотобактера на щавелевой кислоте как единственном источнике углерода. Азотобактер упорно отказывался развиваться на этом веществе. Тогда была сделана попытка его выращивания на сахаре в присутствии щавелевой кислоты, и при этом выявилось, что при определенных дозах щавелевой кислоты он не растет и на сахаре, что ясно следует из табл. 9.

Продолжительность опыта соответствовала 4 месяцам, и несмотря на это в большинстве вариантов сахар оказался неиспользованным.

Таблица 9

Влияние на фиксацию азота атмосферы Azotob. agile щавелевой кислоты (калиевая соль)

Концентрация щавелево-кислого калия в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг		Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем	
0,000	1,80 1,80	100,0	13,71 14,37	14,04	100,0
0,005	1,70 1,65	93,1	14,27 14,30	14,28	101,7
0,010	1,60 1,55	87,5	11,10 12,17	11,68	83,4
0,025	0,40 0,35	20,8	19,38 18,00	18,69	133,1
0,050	0,25 0,40	18,1	18,20 18,73	18,47	132,0
0,100	0,20 0,25	12,5	19,40 18,37	18,88	134,9

Щавелевая кислота, внесенная в питательную среду в форме калиевой соли, чрезвычайно резко подавляет дыхание. Повидимому, она связывает железо дыхательного фермента аналогично с цианистыми солями и нарушает углеводистый метаболизм в клетках азотобактера. Подтверждением правильности этого предположения может служить то обстоятельство, что добавление в среду с щавелевой кислотой и сахаром связанных соединений азота (аспарагиновая кислота, аммиачные соли) не дает никакого эффекта. Азотобактер упорно не желает размножаться в среде с щавелевой кислотой, если ее концентрация превосходит 0,05 моля. Существо дела здесь, повидимому, связано с невозможностью окисления сахара, так как фиксация азота атмосферы во всех вариантах опыта, где развился азотобактер, оказалась превосходящей 100%. Если бы в фиксации азота атмосферы участвовал тот же ферментный аппарат, что и в дыхании, подобный результат не должен был бы иметь места. Поэтому теория Блома [12] и ее аммиачная модификация Гапона [2], принимающие за основу фиксации молекулярного азота азотобактером взаимодействие азота или с водой (Блом), или с молекулярным водородом (Гапон), при участии железосодержащего (геминного) фермента теряют свое значение и оказываются необоснованными. В последнем случае невозможность такого хода процесса обусловливается еще и тем, что для восстановления азота требуется молекулярный водород, а его образование в культурах азотобактера, растущего тонкой пленкой на самой поверхности жидкой питательной среды, совершенно исключается, так как мобилизованный дегидразами из органического вещества водород не будет иметь недостатка в таких первоклассных акцепторах, как активный кислород.

Выводы

1. Поверхностно-активные вещества (спирты и насыщенные кислоты жирного ряда) весьма сильно подавляют процесс фиксации азота атмосферы азотобактером. При этом выявляется определенная зако-

номерность: чем выше поверхностная активность используемого вещества, тем сильнее он и подавляет азотфиксацию.

2. Угнетающее воздействие поверхностно-активных веществ обусловливается, повидимому, тремя причинами: 1) возможной блокировкой пограничных поверхностей катализатора, принимающего участие в азотфиксации путем вытеснения с них реагирующих веществ, 2) нарушением связи между активной группой катализатора и его коллоидным носителем и 3) изменением состояния коллоидного носителя.

3. Обезвоживающие вещества (ацетон, хлористый натрий) в первую очередь приостанавливают дыхание, а затем уже и азотфиксацию. Их воздействие на живую клетку связано, повидимому, с денатурацией плазменных коллоидов и поэтому сразу прекращает развитие организма, как только концентрация достигнет определенного уровня.

4. Щавелевая кислота резко подавляет дыхание, повидимому, за счет связывания железа дыхательного фермента, но не мешает фиксации молекулярного азота азотобактером. Поэтому теории, основанные на допущении, что в азотфиксации участвует железо геминного фермента (Блом, Гапон), лишены основания.

Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева

Получено 25. II. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Гапон Е. О механизме фиксации азота атмосферы азотобактером. Микробиология, XVI, 204, 1947.
2. Гапон Е. Теория фиксации азота атмосферы микроорганизмами. ДАН, 58, № 2, 249, 1947.
3. Насонов Д. и Александров В. О механизме токсического действия веществ на протоплазму. Биол. журнал, 6, 117, 1937.
4. Насонов Д. и Александров В. Реакция живого вещества на внешнее раздражение, М.—Л., 1940.
5. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером поверхностно-активных веществ. Микробиология, XIV, 146, 1945.
6. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером наркотиков. Микробиология, XV, 23, 1946.
7. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером веществ, реагирующих с аминной группой катализатора азотфиксации. ДАН, 49, вып. 9, 1945.
8. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером веществ, реагирующих с карбонильной группой катализатора азотфиксации. ДАН, 50, вып. 1, 1945.
9. Федоров М. Влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером веществ, реагирующих с карбоксильной группой катализатора азотфиксации. ДАН, 51, 1, 1946.
10. Федоров М. Химизм фиксации азота атмосферы азотобактером. Микробиология, XV, 6, 1946.
11. Федоров М. Биологическая фиксация азота атмосферы. Монография, Сельхозгиз, Москва, 1948.
12. Эггерт, Д. Физическая химия, 1931, М.—Л.
13. Blom J. Ein Versuch, die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des molekularen Stickstoffs durch Mikroorganismen zu erklären. Ctbl. Bakt., II Abt., 84, 60, 1931.

ДВА ВИДА МИКОБАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ МЕТАН

Н. Б. Нечаева

Метан широко распространен в природе. Его выделение можно наблюдать при анаэробных биологических процессах распада органических веществ, в почве и в иловых отложениях. Он может выделяться в каменноугольных рудниках, в нефтяных и газовых месторождениях, где образует обширные подземные скопления.

Изучение процессов образования метана показало, что одновременно происходит и окисление его до углекислоты и воды биологическим путем.

Группа организмов, окисляющих метан, до сих пор еще мало исследована, хотя в литературе нам часто приходится встречать указание, что в процессе окисления метана принимают участие разнообразные организмы.

Например, Россолимо и Кузнецова [5] пишут, что они выделили в чистых культурах ряд палочкообразных бактерий, окисляющих метан, но при этот не дают подробного описания изолированных форм.

Таким образом, и по настоящее время остаются известными только Bac. methanicus Söhngen [11] и Bact. methanicum Münz [10], которые следует считать, повидимому, разными штаммами.

Мюнц отмечал в своей работе, что невозможно было отождествить Bact. methanicum Münz с Bacillus methanicus Söhngen, так как Зонген четко не разграничил характеристику роста смешанной культуры от чистой культуры.

Зонген указывал, что у Bacillus methanicus вырастала плотная пленка, окрашенная в довольно яркий коричнево-красный цвет. У Bact. methanicus наблюдалась «плесневидная» пленка серо-белого цвета, во многих случаях она была еле заметна.

Мюнц предполагал, что окраска пленки может зависеть от нескольких причин — от выращивания метанокисляющих бактерий на питательных средах различного состава, в различных смесях газов, при совместном росте с другими микроорганизмами, выделенными из накопительной культуры. В последнем случае окрашивание пленки могло появляться под влиянием продуктов обмена спутников метанокисляющих бактерий.

Чтобы убедиться в правоте своего предположения, Мюнц провел с Bact. methanicum ряд опытов, но и после этого он не получил пленок с коричневой окраской, так что должен был притти к заключению, что у Зонгена имелась иная накопительная культура, чем у него.

Такое неопределенное положение с группой микроорганизмов, окисляющих CH_4, и заставило нас заняться их изучением.

Методика

Метанокисляющие бактерии культивировались в атмосфере смеси воздуха и метана. Отношение метана к воздуху бралось различное, но наилучшим оказалось — 1 часть метана на 2 части воздуха.

Выращивание культур занимало от 10 до 30 дней. За этот период времени ватные пробки в пробирках обычно прорастали плесенью и за-

грязняли культуры. Ввиду этого мы заменили их стеклянными цилиндриками, которые плотно надевались на пробирки. Такое приспособление охраняло культуры от заражения их из воздуха. Культуры выращивались на жидких и агаровых минеральных средах с различными источниками азота (Kaserer [9], Bushnell and Haas [8]) при температуре 27—28°.

Среда Казерера. Дестиллированной воды — 1000 мл, NH_4Cl — 1 г или KNO_3 — 2 г, K_2HPO_4 — 0,5 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2 г, $FeCl_3$ — следы. Среда усреднялась $NaHCO_3$ до pH = 7,0—7,2.

Среда Bushnell и Haas. Дестиллированной воды — 1000 мл, NH_4NO_3 или $(NH_4)_2SO_4$ 1 г, KH_2PO_4 — 1 г, K_2HPO_4 — 1 г, $MgSO_4$ — 0,2 г, $FeCl_3$ — 2 капли концентрированного раствора, $CaCl_2$ — 0,02 г. Среда доводилась до pH = 7,0—7,2 с помощью раствора NaOH.

Перед употреблением агар-агар тщательно промывался в текучей воде.

Постановка опытов на определение интенсивности окисления метана проводилась следующим образом.

В определенный объем раствора NaCl (0,8%) вводился посевной материал измерительной пипеткой. Раствор хорошо взбалтывался, чтобы разъединить между собой клетки; для заражения в серию опытных сосудов с питательной средой вносилось определенное количество суспензии.

В газовой смеси, находящейся под вакуумным колпаком, где культивировались метаноокисляющие бактерии, определялось количество CO_2 и O_2 перед опытом и после него с помощью прибора Орса [4]. Полученные данные приводились к 0° температуре и к давлению атмосферы в 760 мм.

На основании опытных данных высчитывали количество поглощенного метана, принимая, что на окисление одной молекулы метана используются две молекулы кислорода.

Экспериментальная часть

Задачей нашего исследования являлось выяснение вопроса, какие микроорганизмы участвуют в биологическом окислении метана и насколько они широко распространены в природе.

Для выделения бактерий мы пользовались илами из различных водоемов и сброженными осадками из метан-тэнков.

Изучение этого материала показало, что метаноокисляющие бактерии широко распространены в природе. Это подтверждается и данными из обзорной статьи Кузнецова [3], но метаноокисляющие бактерии не отличаются разнообразием форм.

В накопительных культурах на минеральных средах мы всегда наблюдали плотные и окрашенные пленки. Пленки состояли в большинстве случаев из бактерий и простейших. Постепенно освобождаясь от простейших и от бактериальных спутников метаноокисляющих бактерий, пленки становились в культурах все более и более нежными.

От простейших избавиться было очень трудно, и достаточно было занести при пересеве один-два их экземпляра, чтобы они быстро размножились и уничтожили все бактериальное население культуры. Бороться с ними приходилось только частыми пересевами культур в очень молодом возрасте и засевая целые серии пробирок. Когда же в старых культурах сохранялись бактериальные пленки и при микроскопировании не обнаруживались простейшие, то тогда начиналось разделение культур на отдельные бактериальные формы и проверка их на способность окислять метан.

Таким образом, были выделены две микобактерии из сброженных осадков метан-тэнков Люблинской станции аэрации.

На минеральных жидких средах микроорганизмы (бесцветная и желтая формы) использовали метан как единственный источник углерода и энергии в этих условиях. В отсутствие метана культуры не развивались.

Морфологически обе микобактерии почти не отличались друг от друга. Они представляли собой палочки клинообразной или согнутой формы различной величины — от 0,8 до 5,0 μ × 0,6—0,7 μ. Клетки располагались попарно под углом.

Ветвление палочек наблюдалось только у микобактерии с желтым пигментом на сусло-агаре и на минеральной среде с углеводами (морфология форм изучалась на разнообразных средах).

Цикл развития у обеих бактерий состоял из превращения палочек в кокковидные клетки. У бесцветной формы палочки переходили в шарообразные клетки диаметром 0,7 μ, укорачиваясь большей частью через двое суток от начала развития. Превращение же палочек в круглые клетки желтой формы происходило значительно медленее, чем у бесцветной. Кокки не отделялись друг от друга и образовывали четковидные цепочки.

Палочки желтой микобактерии часто лежали в слизи. Плазма их красилась очень неровно, наиболее ярко окрашивались зернышки метахроматина на полюсах. Клетки этой микобактерии легко подвергались автолизу, и тогда их зернистое содержимое выходило в окружающую среду.

Микобактерии размножались делением; их клетки неподвижны и грамположительны.

Бесцветная форма развивалась на поверхности жидких минеральных сред в присутствии метана в виде нежной голубоватой пленки, сильно поднимающейся вверх по стенкам сосудов.

В атмосфере из смеси метана и воздуха на агаровых минеральных средах вырастали полупрозрачные, плоские, матовые, сухие, морщинистые и бесцветные колонии наподобие розеток (рис. 1).

Такой же характер роста колоний наблюдался на белковых и картофельных средах с агаром. Сусло-агар и добавление глюкозы или маннита к МПА усиливали рост, и налет окрашивался в серо-белый цвет (рис. 2). На ломтиках картофеля и на крахмальном агаре образовывались почти совсем прозрачные налеты. На МПБ наблюдался замедленный рост. Муть появлялась только на 5-й день после посева; к этому же времени развивалась очень нежная, голубоватая пленка, всползающая на стенки пробирок. Очень скоро бульон просветлялся и на дно сосуда выпадал большой хлопьевидный осадок серо-белого цвета. Если к бульону добавлялся глицерин, то отмирание клеток шло еще быстрее.

Микобактерия медленно редуцировала нитраты до нитритов в белковой среде, на жидкой же минеральной среде в присутствии метана восстановление нитратов не происходило.

На средах из сусла с естественной реакцией не было роста. После же подщелачивания (pH=7,2) появлялась обычная нежная пленка, состоящая из палочек нормального вида. Молоко оставалось без изменения. На среде Хетчинсона с клетчаткой не замечалось роста в течение месяца (табл. 1 и 2). На жидкой минеральной среде с аспарагином или с углеводами развивалась пленка обычного характера, но интенсивность ее роста на среде с углеводами была очень различна. Всего лучше образование пленок происходило на средах с маннитом и глюкозой.

В культурах с углеводами цикл развития замедлялся, и еще на 9-й день можно было наблюдать много палочек, хотя палочки и кокки уже сильно были раздуты; это явление особенно заметно в культурах с сахарозой и декстрином.

Желтая микобактерия образовывала нежную мелкосетчатую опалесцирующую пленку на жидких минеральных средах в атмос-

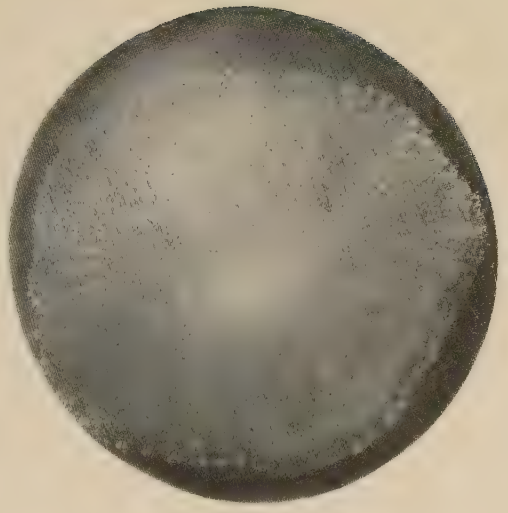


Рис. 1. Колония Mycobacterium methanicum n. sp. на агаре Казерера в присутствии метана (13 дней роста). Колония увеличена в 75 раз

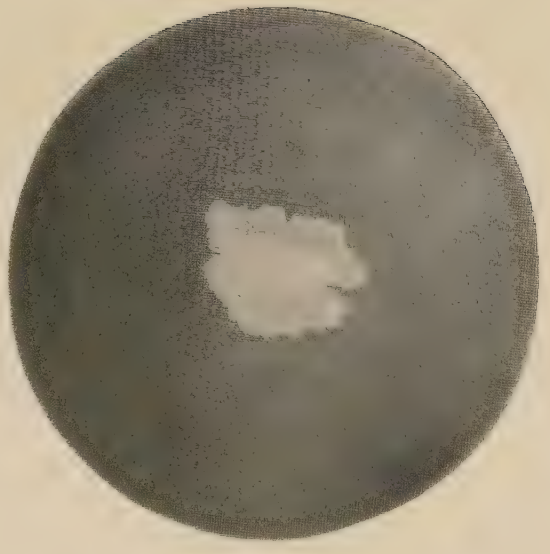


Рис. 2. Гигантская колония Mycobacterium methanicum n. sp. на агаре Казерера с 1% маннита (6 дней роста). Естественная величина

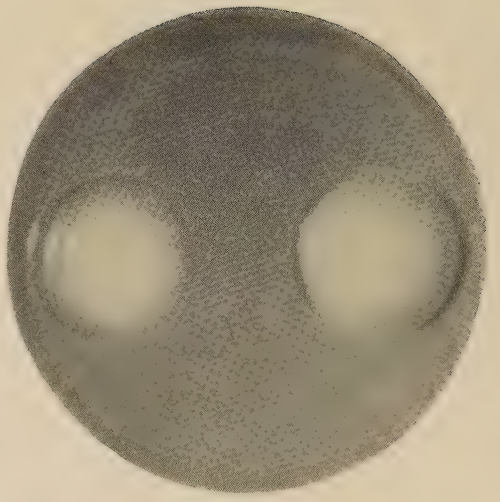


Рис. 3. Колония Mycobacterium flavum v. methanicum на агаре Казерера в присутствии метана (13 дней роста). Колонии увеличены в 30 раз

Таблица 1

Рост метаноокисляющих микобактерий на органических средах

Название вида	МПА	МПЖ	МПБ	МПБ + 0,1% KNO_3	МПБ + 1,5% глицерина	Сусло агар pH = 7,2	Сусло подщелоченное pH = 7,2	Молоко	Картофель	Картофельный агар	Крахмальный агар	Среда Хетчинсона + + клетчатка	Среда Казерера + + 0,1% аспарагина
Mycobacterium methanicum n. sp. . . .	++	++	+	++	+	+++	++	—	+	++	+	—	++
Mycobacterium flavum v. methanicum	++	++	+	+	+	+++	+	+	+++	++	++	—	+

Примечание. +++ хороший рост; ++ удовлетворительный рост; + слабый рост; — отсутствие роста.

Таблица 2

Ферментативная деятельность метаноокисляющих микобактерий на различных питательных средах

Название вида	Образование		Разжижение желатины	Образование кислот на МПА + глюкоза	Гидролиз крахмала	Расщепление говяжьего жира, среда Казерера	Восстановление нитратов		Окисление			
	H_2S	NH_3					МПБ	Минер. среда в присутствии CH_4	CH_4	C_2H_6 *	C_7H_{16}	парафина
	белковые среды								среда Казерера			
Mycobacterium methanicum n. sp.	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—
Mycobacterium flavum v. methanicum	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—

* К сожалению, мы не смогли достать еще другие углеводороды.

Примечание. — отсутствие процесса; + наличие процесса.

фере смеси воздуха с метаном, а на минеральном агаре развивались круглые, выпуклые, гладкие, слизистые, блестящие колонии (рис. 3). В начале колонии были белого цвета, а потом они становились светло-желтыми.

Бактериальные колонии имели на органическом агаре и желатине такой же вид, как и на минеральном агаре. На сусло-агаре они сливались в выпуклый стекающий налет охряного цвета.

На ломтиках картофеля вырастал бугристый налет желто-бурого цвета. На чистом МПБ и с добавлением глицерина или нитратов образовывалась слабая муть в первый день роста (на 5—6-й день после посева). Муть быстро исчезала, а на дне сосудов появлялся небольшой желтеющий осадок.

Культуры не редуцировали нитратов в нитриты ни на белковых, ни на минеральных средах.

На поверхности подщелоченного сусла так же, как и на сусле с его естественной реакцией, вырастали отдельные маленькие слизистые колонии. Культура производила впечатление отмирающей, так как часть клеток лежала в слизи, а остальные подвергались уже автолизу.

В молоке наблюдались желтое кольцо на стенках пробирок и желтый осадок. Молоко немного подщелачивалось (табл. 1, 2).

На минеральных средах с различными углеводами желтая микобактерия развивалась совсем иначе, чем бесцветная. Она росла медленнее, и клетки ее скорее ослизнялись и образовывали инволюционные формы, которые в конце концов автолизировались.

Всего ярче этот процесс наблюдался на средах с глюкозой или сахарозой. На этих средах уже с третьего дня начиналось отслаивание нижних частей пленки, которые образовывали на дне сосудов большой хлопьевидный осадок желтоватого оттенка. В культурах с глюкозой и сахарозой палочки соединялись в довольно длинные цепочки. Цепочки же переплетались между собой в настоящие клубки (культура с сахарозой). В молодых культурах на средах с углеводами наблюдалась не только нормальная палочка (согнутая), но и ветвистая.

После изучения микобактерий было приступлено к их определению. Бесцветная форма оказалась новым видом и по предложению Красильникова [1] названа Mycobacterium methanicum n. sp.

Вторую форму — желтую — можно было отождествить с Mycobacterium flavum, но, чтобы указать на ее характерно приспособительное свойство использовать метан в отсутствие других органических веществ, к ее видовому названию добавлено v. methanicum.

Как показали опыты, чистые культуры метанокисляющих бактерий обладали способностью окислять метан и размножаться на жидкой минеральной среде в присутствии метана. Данные, характеризующие интенсивность окисления метана микобактериями, приведены в табл. 3.

Из нее видно, что Mycobacterium methanicum n. sp. энергичнее окисляла метан, чем Mycobacterium flavum v. methanicum, и, повидимому, это находится в связи с тем, что клетки Mycobacterium flavum v. methanicum легко ослизнялись и тогда делались малоактивными в смысле окисления метана.

Кроме того, был поставлен контроль для определения поглощаемости метана самой минеральной средой. Через 26 дней опыт был снят. В газовой смеси над средами не произошло никаких изменений.

При подсчете бактерий в препаратах, сделанных из посевов в начале постановки опыта в метане и из культур после снятия опыта, можно было видеть большой прирост клеток. К сожалению, в культурах нельзя было подсчитать всех клеток, так как встречались их большие скопления в слизи. В посевах же, оставленных стоять при обычной атмосфере или в очищенном воздухе (воздух освобождался от CO_2 и органических веществ), число бактерий уменьшалось вследствие автолиза клеток.

Выделенные микроорганизмы не способны к самостоятельному свечению в лучах Вуда (диапазон ультрафиолетовых лучей 300—400 мμ).

Окрашенные флуорохромом, они светились довольно ярко при флуоресцентной микроскопии. Эти данные согласуются с результатами Славниной [6, 7], применившей флуоресцентный метод к диагностике отдельных видов углеводородоокисляющих бактерий.

Чтобы выяснить отношение изучаемых микобактерий к другим углеводородам, ставились опыты с пропаном и гептаном (постановка опытов такая же, как для метана, гептан же как жидкий углеводород на-

[1] Приношу большую благодарность Н. А. Красильникову за оказанную мне помощь при определении микобактерий (2).

Таблица 3

Интенсивность окисления метана микобактериями

Название микроорганизмов	Срок культивирования в днях	pH		Поглощение O_2 в см³	Окисление CH_4 в см³ по пересчету	Опыт в атмосфере
		начальное	конечное			
Mycobacterium methanicum n. sp.	19	7,37	6,75	112,0	56,0	CH_4 + воздух
Контроль	19	7,37	6,72	—	—	Воздух
Mycobacterium methanicum n. sp.	6	7,41	7,20	71,0	35,5	CH_4 + воздух
То же	6	7,41	7,20	—	—	Воздух
Mycobacterium flavum v. methanicum	32	7,37	7,22	29,4	14,7	CH_4 + воздух
То же	32	7,37	—	—	—	Очищенный воздух
» »	25	7,37	7,22	56,0	28,0	CH_4 + воздух
» »	25	7,37	7,14			
» »	25	7,37	7,14	—	—	Очищенный воздух
» »	25	7,37	6,53	—	—	Воздух
Контроль	25	7,37	6,74	—	—	»
Mycobacterium flavum v. methanicum	26	7,37	6,94	76,0	38,0	CH_4 + воздух
То же	26	7,37	6,77			
» »	26	7,37	6,59	—	—	Воздух
» »	25	7,43	6,94	60,2	30,1	CH_4 + воздух
» »	25	7,43	6,94			

ливался в открытый стаканчик и ставился вместе с культурами под вакуумный колпак). Полученные результаты показали, что пропан окисляется обеими формами, а гептан — только Mycobacterium flavum v. methanicum [1]. При этом организмы не теряли способности вновь развиваться на жидких минеральных средах в присутствии метана, как показали последующие пересевы культур.

Заключение

Как указывалось выше, мы провели исследование довольно большого числа образцов ила с целью изучить группу микроорганизмов, окисляющих метан. В данном сообщении дается описание только двух метанокисляющих микобактерий, изолированных из осадков, сброженных в метан-тэнках.

Выделенные микобактерии способны вести как автотрофный, так и гетеротрофный образ жизни. Такое явление за последние годы отмечалось уже нередко у бактерий, относимых прежде к строго автотрофным организмам.

Исследование чистых культур метанокисляющих бактерий показало, что при развитии на белковых средах происходило ослизнение бактериальных клеток с потерей способности окислять метан при обратном пересеве на жидкую минеральную среду. На МПБ культуры быстро погибали, а у Mycobacterium flavum v. methanicum то же явление наблюдалось вообще на всех жидких органических средах. На минеральных же средах в присутствии метана наблюдался нормальный рост.

При длительном культивировании микобактерии постепенно приобретали способность нормально развиваться на белковых средах и не погибали при пересевах с этих сред в жидкие минеральные растворы (в присутствии метана).

В морфологическом отношении Mycobacterium methanicum n. sp. и Mycobacterium flavum v. methanicum были похожи друг на друга. Они представляли собой вибрионообразные палочки. Ветвление встречалось только у последней микобактерии на некоторых органических средах, как нами уже указывалось. Палочки Mycobacterium flavum v. methanicum окрашивались неровно,— обычно на концах клеток ярко выступали зерна метахроматина. Палочки часто лежали в слизи.

Исследованные микобактерии отличались по характеру роста на различных питательных средах. Даем краткое описание их культуральных признаков.

Mycobacterium methanicum n. sp.

Жидкая минеральная среда (в присутствии метана). Нежная голубоватая пленка, поднимающаяся вверх по стенкам сосудов.

Жидкие органические среды (МПБ, сусло подщелоченное и минеральные среды с углеводами). Такого же характера пленка, как на минеральной среде. Кроме того, в МПБ муть и осадок.

Минеральный агар. Полупрозрачные, бесцветные, плоские, матовые, сухие колонии в виде розеток.

Агар на белковых и картофельных средах. Такие же колонии, как на минеральном агаре.

Крахмальный агар. Налет почти совсем прозрачный.

Сусло-агар и МПА с глюкозой. Налет выпуклый, серо-белого цвета.

Картофельные ломтики. Еле заметный рост.

Молоко. Без изменения.

Микобактерия способна окислять не только метан, но и пропан на жидкой минеральной среде.

Mycobacterium flavum v. methanicum

Жидкая минеральная среда (в присутствии метана). Нежная, мелкосетчатая, опалесцирующая пленка.

Минеральный агар. Круглые, выпуклые, гладкие, блестящие колонии светложелтого цвета.

Агар на органических средах. Колонии похожи на колонии с минерального агара.

Сусло-агар. Очень хороший, стекающий налет охряного цвета.

Картофельные ломтики. Очень хороший бугристый налет буро-желтого цвета.

Сусло подщелоченное. Почти нет роста.

Минеральная среда с углеводами. Накипь, пленки и быстрое образование осадка с желтоватым оттенком.

Молоко. Желтое кольцо и осадок. Молоко подщелачивалось.

Микобактерия способна использовать, кроме метана, также пропан и гептан как единственные источники углерода и энергии на жидкой минеральной среде.

Выводы

1. Выделены две бактерии, окисляющие метан на минеральной среде и относящиеся к роду Mycobacterium.
2. Одна из них представляет собой новый вид и названа Mycobacterium methanicum n. sp.
3. Mycobacterium methanicum n. sp. и Mycobacterium flavum v. methanicum являются факультативными автотрофами.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 1. III. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокова Е. и Смирнова З. Бактериальные методы поисков нефти и газа, Новости нефтяной техники, Москва, 1947.
2. Красильников Н. А. Определитель лучистых грибков. Изд. АН СССР, М.—Л., 1941.
3. Кузнецов С. И. Проблема автографии у микроорганизмов. Микробиология, XVII, 307, 1948.
4. Лидов А. П. Анализ газов, 1928.
5. Россолимо Л. и Кузнецова З. Донное газоотделение как фактор кислородного режима озер. Тр. Лимнологической станции в Косине, **17**, стр. 87, 1934.
6. Славнина Г. П. Обнаружение углеводородных бактерий методом флуоресцентной микроскопии. Новости нефтяной техники, Москва, 1947.
7. Славнина Г. П. Применение флуоресцентного метода для исследования некоторых видов бактерий, окисляющих углеводороды. Микробиология, XVII, 76, 1948.
8. Bushnell L. D. a. Haas H. F. The Utilisation of certain Hydrocarbons by Microorganisms. J. Bact., **41**, 653, 1941.
9. Kaserer H. Über die Oxydation des Wasserstoffes und des Methans durch Microorganismen. Ctbl. Bact., Abt. II, **15**, 573, 1906.
10. Münz E. Zur Physiologie der Methanbacterien. Diss., Halle, 1915.
11. Söhngen N. L. Über Bacterien welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. Ctbl. Bakt., Abt. II, **15**, 513, 1906.

РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВЫВЕТРИВАНИИ ГОРНЫХ ПОРОД

1. МИКРОФЛОРА ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ СКАЛЬНЫХ ПОРОД

Н. А. Красильников

Хотя в микробиологии накопилось достаточно наблюдений о геологической деятельности микроорганизмов, тем не менее многие ученые не только среди геологов, но и среди почвоведов стоят на той точке зрения, что процесс «выветривания горных пород», дробление их и превращение их в рухляк протекают под влинием физико-химических и механических факторов. Биогенные и, в частности, микробиологические факторы в этом процессе, по мнению многих почвоведов, исключаются (Кравков [4], Захаров [3] и др.).

Вернадский [1, 2] писал, что изучать процессы «выветривания» горных пород только с точки зрения физико-химических явлений — это значит показывать отсталость данной области химической геологии. Процесс выветривания горных пород, писал он, есть биокосный процесс. К изучению этого процесса следует подходить биогеохимически. Иными словами, в разрушении горных пород участвуют физические, химические и биологические агенты.

Полынов [6] впервые приступил к подробному изучению начальных стадий образования почвы с этих позиций. Он со своими сотрудниками концентрирует внимание на лишайниках, изучает их действие на процесс разрушения горных пород (Полынов [6, 7], Ярилова [10]). В этих работах даны наглядные доказательства разрушительного действия лишайников.

По нашим наблюдениям, в разрушении горных пород принимают активное участие микроорганизмы — бактерии, грибы, актиномицеты и водоросли. В предыдущей работе [5] мы приводили материал о массовом развитии разных микроорганизмов в теле лишайников и отмечали, что последние являются накопителями этих существ и в поверхностном слое скальной породы.

Специалистам хорошо известно, что скальные породы часто обрастают лишайниками (рис. 1). Эти загадочные симбионты нередко покрывают поверхность горных массивов сплошным толстым слоем. Как правило, под ними порода изменяется на бóльшую или меньшую глубину, образуется хорошо выделяющийся по цвету поверхностный слой (рис. 2). Этот слой отличается от основной неизмененной породы рядом других химических и физических свойств. Он менее прочный, легко поддается обработке, чаще всего окрашен в буроватый или светложелтый цвет.

Толщина такого слоя различна в разных случаях, в зависимости от породы каменных массивов, условий местонахождения и продолжительности роста на них лишайников. Она колеблется от 1 до 5 мм, а в отдельных случаях достигает 10 мм.

Измененный слой на поверхности скальных пород наблюдается нередко и на массивах, не обросших лишайниками. Он также бывает различной толщины — от 1 до 5 мм, выделяется своей буроватой окраской и меньшей прочностью.

Этот измененный поверхностный слой каменистых пород был предметом наших исследований. Нас интересовало наличие жизни в этом нарушенном поверхностном слое. Существуют ли в нем микроорганизмы? С этой целью мы откалывали молотком небольшие кусочки породы с измененным поверхностным слоем.

Собранные образцы завертывались в стерильную бумагу, доставлялись в лабораторию, где они подвергались микробиологическому анализу. Во многих случаях образцы каменных пород обрабатывались в день сбора в секторе микробиологии Академии Наук Армянской ССР. Большинство же образцов доставлялось в Москву, в Институт микробиологии АН СССР, где они исследовались после более или менее длительного пребывания в сухом состоянии (от 1,5 до 2 месяцев от времени сбора).

В лаборатории поверхность собранных образцов каменных монолитов механически освобождалась от лишайников, затем промывалась, тщательно обмывалась стерильной водой с тем, чтобы очистить ее от поверхностных микроорганизмов. После высушивания стальным напильником соскабливалась послойно порода измененного поверхностного слоя. Получаемый мелкий порошок в определенной навеске высевался на питательные среды, агаризованные и жидкие.

В каждом образце мы исследовали соскобы, взятые в 3—4 горизонтах. Первый, самый поверхностный — 0,2 мм, второй — в 3—5 мм от поверхности, третий — в более глубокой части, 6—8 мм (не всегда) и последний — в более глубокой части, не подверженной изменениям.

Наибольшее число образцов было собрано с базальтовых пород Армении, затем исследовались туфы, красные и черные, и несколько образцов гранита и известняка.

Для посевов соскобов, взятых с каменных пород, мы применяли питательные среды разного состава: мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), сусло-агар (СА), синтетическую среду Чапека и безазотистую среду Эшби.

Испытуемый материал высевался на агаризованные среды в чашки Петри непосредственно порошком, реже порошок (соскоб с каменной породы) предварительно разводился в воде, и полученная водная взвесь высевалась на среды обычным порядком. Инкубация посевов производилась при 20—25° 5—20 суток.

Всего было обследовано таким способом около 50 образцов базальтов и туфа. Результаты этих исследований показывают, что измененный на глаз поверхностный слой скалистых пород, покрытых лишайниками, заселен микроорганизмами в большей или меньшей степени. Мы насчитывали от 5000 до 100 000 зародышей в 1 г породы, причем распределение их в измененном слое неравномерно.

Наибольшее число микроорганизмов обнаруживается в первом горизонте — 0—2 мм от поверхности, по мере углубления их становится меньше, и они совсем не обнаруживаются ниже измененного слоя, в нетронутой глыбе породы (табл. 1). В табл. 1 приведены средние показатели данных анализов.

Как видно из этих цифр, наиболее обильное развитие микробного населения происходит в поверхностном слое базальтовых и гранитных массивов, меньше — в туфовых породах.

В глубине монолитов, ниже измененного слоя, порода, как правило, стерильна (относительно, конечно), если только в ней нет трещин; иными словами, наличие микроорганизмов в этой части современными методами не обнаруживается.

Нами обследовано 20 образцов скалистых пород, собранных с необрастающих лишайниками участков и отдельных камней в разных районах Армении, из них 10 с измененным поверхностным слоем, а 10 — с неизмененным. Анализ таких образцов показывает, что последние не заселяются и микроорганизмами. На таких массивах микробы не обна-

Таблица 1

Численное распределение микроорганизмов по горизонтам в поверхностном слое каменных пород. Число клеток в 1 г породы

Глубина в мм	Заросшие лишайниками			Не заросшие лишайниками	
	базальт	туф	гранит	базальт	туф
0—2	100 000	10 000	150 000	5 000	1 700
3—5	45 000	5 000	65 000	100	0
7—10	5 000	100	10 000	0	0
20—30	0	0	0	0	0

руживаются или обнаруживаются в небольшом числе и только на самой поверхности монолитов (табл. 1); повидимому, они являются заносными формами.

В монолитах, свободных от лишайников, имеющих измененный поверхностный слой, микроорганизмы обнаруживаются в значительном числе. На двух образцах известняка и на четырех образцах гранита и базальта, где имелись заметные изменения поверхностного слоя, но не было лишайников, мы выявили развивающиеся бактерии, актиномицеты, дрожжи и грибы, а равно и водоросли. В образцах известняка содержалось в поверхностном слое 0—3 мм от 50 до 100 тыс. микробных клеток, в том числе около 5000 водорослей. В образцах гранита и базальта получили 60—80 тыс. клеток, среди которых были также водоросли, около 2000 в 1 г.

По качественному составу микрофлора исследованных скалистых пород различна (табл. 2). Основное большинство составляют бактерии, значительно меньше дрожжей, грибов и актиномицетов.

Из бактерий преимущественно обнаруживаются неспороносные формы рода Bacterium и Pseudomonas, затем микобактерии; редко встречаются спороносные палочки и микрококки. Все эти организмы бесцветные. Окрашенные формы обнаруживаются в редких случаях и только среди представителей Bacteriaceae.

Мы не имели возможности изучить более подробно микроорганизмы, обнаруживаемые в других породах. Однако отношение их к питательным субстратам хорошо иллюстрируется табл. 2. Данные табл. 2 показывают, что наибольшее число бактерий развивается на простых синтетических средах — на безазотистой среде Эшби и среде Чапека с минеральным азотом. Значительно меньше бактерий развивается на белковых средах. На сусло-агаре учитывались только грибы и дрожжи; актиномицеты вообще не обнаруживались на этой среде, а бактерии не представляли каких-либо отличий от бактерий, растущих на МПА.

Таблица 2

Групповой состав микроорганизмов в поверхностном слое базальтов и туфа. Число клеток в 1 г породы

Питательная среда	Базальт			Туф		
	бактерии	актиномицеты	грибы	бактерии	актиномицеты	грибы
МПА	4 500	50	20	200	10	0—10
Чапек-агар	10 000	200	200	6 500	50	10
Эшби-агар	150 000	500	100	10 000	50	0—10
Сусло-агар	—	—	1 000	—	—	20

Рис. 1

Рис. 2

Следует отметить, что на Эшби-агаре хотя число колоний значительно больше, чем на Чапек-агаре, но колонии сами очень мелкие, точечные, едва заметные или совсем незаметные невооруженным глазом, большинство их приходилось рассматривать и подсчитывать при помощи лупы или при малом увеличении микроскопа. Эти колонии состоят из неспороносных бактерий и микобактерий. Характерным для них является неспособность развиваться при последующих высевах на питательные среды. Мы пытались культивировать эти бактерии на разных средах — синтетических (Чапека, Эшби и др.) и белковых (МПА, желатина), жидких и агаризованных. Как правило, при высевах с Эшби-агара они не растут.

Повидимому, здесь мы имеем более или менее специализированные формы бактерий и микобактерий, которые требуют для своего роста наличия особой среды, так как они приспособились к определенным условиям существования.

Бактерии, развивающиеся на обычных белковых средах, а равно и на синтетической среде Чапека, по своим свойствам не отличаются заметно от многих почвенных форм, растущих на тех же средах. Они хорошо перевиваются на питательные среды.

Аналогичные исследования мы провели на образцах известняков, собранных в разных местах средней полосы Советского Союза. Мы подвергли микробиологическому анализу поверхностный слой монолитов в карьерах и отдельных плит и камней, встречающихся на поверхности земли и на различных постройках. В большинстве случаев поверхность исследованных проб была свободна от лишайников, но имела в разрезе с поверхности небольшой измененный слой, выделяющийся более темным цветом. Анализ показал, что такие образцы содержат в поверхностном слое большое число бактерий, меньше микобактерий, грибов и актиномицетов. Много обнаруживается здесь водорослей — зеленых и синезеленых. При засеве на Эшби-агар насчитывается в разных образцах от 10 до 80 тыс. клеток бактерий и до 2000 водорослей в 1 г поверхностного слоя породы. Эти исследования еще не закончены, микроорганизмы пока не изучены, но общая картина полученных результатов та же, что и при исследовании армянских образцов известняка.

Своеобразный процесс разрушения известняковых камней мы наблюдали на полях близ Кинеля Куйбышевской области. На склоне холмистой возвышенности, на полях, в большом количестве лежат одиночками небольших размеров камни, нижняя сторона которых сильно разъедена и имеет вид губки. После тщательной очистки и промывания стерильной водой такая губчатая изъеденная поверхность подвергалась микробиологическому анализу. Камни разламывались молотком, и в изломе измененный поверхностный слой соскабливался и высевался на питательные среды.

Анализы показали наличие только бактерий и очень мало актиномицетов. Водорослей мы не обнаруживали. Бактерии проникают в глубину камней не более 5 мм. Число бактерий насчитывалось от 50 до 200 тыс. в 1 г поверхностного слоя исследованных образцов камней.

В итоге всего изложенного можно заключить, что в процессе разрушения горно-скалистых пород принимают большое участие бактерии. Под лишайниками, а во многих случаях независимо от наличия лишайников, поверхность скальных пород — базальта, туфа, известняка, гранита,— надо полагать и других, заселяется прежде всего бактериями, микобактериями, актиномицетами, грибами и водорослями — автотрофами и гетеротрофами. Эти организмы своими выделениями разрушают с поверхности каменистые породы; вторгаются в глубину их, образуя видимый на глаз поверхностный слой или «кору выветривания». Следовательно, Полынов [8] прав, когда рассматривает бактерий как первых поселенцев на необитаемых скальных породах. Эти микро-

организмы своими кислыми выделениями разрушают породу, а продукты распада последней в виде отдельных элементов усваивают как источники минерального питания.

В тех случаях, когда бактерии и другие микроорганизмы развиваются в поверхностном слое скальной породы под лишайниками, они используют органические выделения последних в качестве энергетического материала. Из предыдущих наших исследований [5] видно, что лишайники своими выделениями могут прокормить громадное число микроорганизмов.

В скальных породах, свободных от лишайников, микроорганизмы используют источники углеродистого питания, выделяемые свободноживущими водорослями, которые, как видно из изложенного, почти всегда обнаруживаются вместе с бактериями, актиномицетами и грибами.

Развитие их не ограничивается прибрежными и подводными известняковыми породами. Водоросли, менее специализированные, как правило, обитают на разных скальных породах, не только омываемых водой, но на суше, на горных вершинах и в долинах.

Таусон [10] наблюдал массовое совместное развитие водорослей и бактерий на скальных породах, на вершинах гор Памира и Кавказа, где они образуют большие «натеки». Они вместе с бактериями, микобактериями и грибами внедряются в глубь породы, растворяют ее, подготовляя, таким образом, почву для других последующих поселенцев растительного и животного мира. Этим ценозам, состоящим из свободно живущих бактерий, актиномицетов, грибов и водорослей, принадлежит первейшая и наибольшая роль в разрушении скальных пород в современных условиях эволюции почв.

Следует отметить, что многие бактерии, а может быть грибы и актиномицеты, способны сами ассимилировать углекислоту из атмосферы и синтезировать органическое вещество, используя при этом энергию, образуемую при окислении неорганических восстановленных соединений горных пород.

Такие бактерии — автотрофы или протрофы — могут существовать без водорослей и лишайников. Полынов [9] и другие ученые рассматривают этих бактерий как первейших из микробов поселенцев, подготавливающих почву для других микроорганизмов.

Выводы

1. Проведены микробиологические исследования нарушенного поверхностного слоя скальных пород — базальта, гранита, туфа, известняка, заросших лишайниками и свободных от них.

2. Установлено, что в этом слое обитает большое число организмов. Основное большинство составляют бактерии и микобактерии, значительно меньше грибов и актиномицетов.

3. В поверхностном слое базальтовых, гранитных и известняковых породах число микроорганизмов больше, чем в породах туфа.

4. Свободноживущие водоросли обнаруживаются на скальных породах, не заросших лишайниками, в относительно больших количествах и являются как бы обязательными спутниками бактериальной и грибной флоры.

5. По биологическим свойствам бактерии скальных пород своеобразны, отличаются от обычных форм и в основном относятся к автотрофам, развивающимся на синтетических средах с минеральными источниками азота.

6. Эти бактерии совместно со свободноживущими водорослями являются первыми поселенцами на первородных, девственных скальных

породах. Они подготавливают почву для лишайников и других организмов.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 8. I. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Вернадский В. Очерки геохимии. Москва, 1927.
2. Вернадский В. Биогеохимические очерки. Москва, 1940.
3. Захаров С. Курс почвоведения. Москва, 1931.
4. Кравков С. Учебник почвоведения. Москва, 1931.
5. Красильников Н. Микрофлора лишайников. Микробиология, XVIII, 224, 1949.
6. Полынов Б. Первые стадии почвообразования на массивно-кристаллических породах. Почвоведение, № 7, 327, 1945.
7. Полынов Б. Основные идеи учения о генезисе элювиальных почв в современном освещении. Юб. сборн. АН СССР, посвященный 30-летию Великой Октябрьской революции, VI, 194, 1947.
8. Полынов Б. К вопросу о роли элементов биосферы в эволюции организмов. Почвоведение, № 10, 594, 1948.
9. Таусон В. Великие дела маленьких существ. Изд. АН СССР, 1943.
10. Ярилова Е. Роль литофильных лишайников в выветривании массивно-кристаллических пород. Почвоведение, № 9, 533, 1947.

ОПТИМАЛЬНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДЕСУЛЬФУРИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А. А. Имшенецкий

Как известно, для определения количества микроорганизмов в почве и воде были предложены различные методы непосредственного подсчета клеток микробов. В дальнейшем было установлено, что, применяя эти методы, можно обнаружить гораздо больше микроорганизмов в исследуемых пробах, чем с помощью посевов. Даже суммируя результаты посевов образца почвы или воды на самые различные элективные питательные среды, обычно получают очень малые числа по сравнению с количеством микроорганизмов, обнаруживаемых прямым методом.

Связано ли это с тем, что современными методами культивирования мы не обнаруживаем всех бактерий, принадлежащих к уже известным физиологическим группам? Может быть, в водоемах или почве существуют неизвестные нам микроорганизмы, не растущие на обычно употребляемых питательных средах, но учитываемые при подсчете клеток? Эти вопросы не могут не стоять в центре внимания микробиологов.

При попытках приблизиться к решению этих вопросов несомненно большую роль должны сыграть новые данные в области физиологии микроорганизмов. За последние годы получено много новых сведений о сущности метабиоза и симбиоза, об азотном питании, а также о потребностях микробов в витаминах и микроэлементах. Стало очевидным, что элективные питательные среды часто неполноценны и что употребление их в микробиологической практике при количественном учете микробов не всегда оправдано. Экспериментальная проверка этого предположения подтвердила его правильность. Отказавшись от применения элективных сред, предложенных для анаэробных целлюлозных бактерий, и заменив их оптимальными белковыми средами с клетчаткой, можно обнаружить в почве и грунте водоемов значительно больше бактерий, сбраживающих целлюлозу (Имшенецкий [1]). Таким образом, «строго элективные» среды менее пригодны для развития некоторых специализированных групп, чем оптимальные питательные среды, при составлении которых нарушен принцип элективности.

В этой статье описаны результаты аналогичных исследований, проведенных с десульфурирующими бактериями.

Экспериментальная часть

Методика

Исследованию подвергались различные образцы почвы и грунта водоемов. Образцы измельчались в стерильной фарфоровой ступке. Затем в одну из питательных сред, состав которых указан ниже, вносился измельченный посевной материал из расчета 1 г почвы или грунта на 10 см³ среды. Таким путем получалось первое разведение 1 : 10. Последующие разведения производились с помощью той же питательной среды, в которой было сделано первое разведение. Среди исследуемых образцов оказались почвы, содержащие очень много десульфурирующих бактерий, и поэтому при анализах делалось значительное число

Посевы почвы и ила на оптимальные и элективные среды для десульфурирующих бактерий

№ опыта	Исследованные образцы	Среда Таусона + 1% дрожжевой воды										Среда Таусона									
		Разведения																			
		1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000	1/1 000 000 000	1/10 000 000 000	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000	1/1 000 000 000	1/10 000 000 000
1	Ил из озера Балхаш	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—[3]	—	—	—	—	—	—
2	Почва из М. Камушек	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	» » оранжереи	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	» » сада	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Ил из озера Хам-Нур	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
6	Почва из клумбы	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
7	Почва № 62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
8	» из оранжереи	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
9	» » Тамбовской области	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
10	» № 105[1]	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
11	» из Грузии	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
12	» № 115	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
13	» № 100	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
14	» № 104	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
15	» из Барыбино	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
16	» с пшеничного поля	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	» № 62	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	» № 69	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	» сильно удобренная[2]	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
20	» из Останкино[2]	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—
21	» » Черниговской области[2]	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
22	» » Ботанического сада	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
23	» с клеверного поля	+	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
24	» » пшеничного поля	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—

[1] При посеве этого образца почвы в 3 и 4-м разведениях на среде с дрожжевой водой развились бактерии, образующие зеленый пигмент.
[2] Опыты поставлены в пробирках.
[3] Склянка разбилась.

разведений до 1 : 10 млрд. Питательные среды, содержащие убывающие количества посевного материала, наливались в склянки емкостью в 50 см³. Склянки плотно закрывались каучуковыми пробками и выдерживались в термостате при 25° в течение месяца. По техническим причинам часть опытов была проведена со склянками вместимостью в 250 см³, а несколько опытов — с пробирками. На протяжении месяца регистрация результатов опыта производилась несколько раз. Появление хотя бы слабого черного осадка принималось как доказательство развития десульфурирующих бактерий. Если осадок в склянках оставался беловатым и культура не имела запаха сероводорода,— делался вывод об отсутствии развития возбудителей десульфуризации. Микроскопии подвергался как осадок в склянке, так и культуральная жидкость. Посевы исследованных образцов производились на элективную, обычно применяемую в микробиологической практике среду и параллельно на оптимальную. В качестве элективной среды применялась среда Таусона как одна из самых лучших. Ее состав следующий: сернокислый аммоний 4,0 г; фосфорнокислый калий (двухзамещенный) 0,5 г; сернокислый магний 1,0 г; сернокислый кальций 0,5 г; соль Мора 0,5 г; молочнокислый кальций 5,0 г; водопроводная вода 1000,0 см³; pH = 7,0. Оптимальной средой была та же среда Таусона, но с добавлением 5% дрожжевой воды в количестве 1%. В процессе работы применялись также и другие среды. Их состав будет указан при описании самих опытов.

Развитие на элективных и оптимальных средах

Среди двадцати четырех исследованных образцов почвы и грунта водоемов некоторые образцы совершенно не содержали десульфурирующих бактерий (опыты №№ 16 и 17). Однако эти образцы составляли исключение. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, подавляющее большинство образцов (22 из 24) дали при их посеве рост десульфурирующих бактерий.

Основное, что прежде всего обращает на себя внимание при анализе результатов опытов,— это более частое развитие десульфурирующих бактерий на оптимальной питательной среде, т. е. на среде с дрожжевой водой. Двадцать четыре анализа дали в общей сложности на среде Таусона 92 положительных результата, а на оптимальной среде — 109. Следовательно, 17 раз оптимальная среда позволила обнаружить десульфурирующие бактерии там, где обычно применяемые среды давали отрицательный результат. Обычно наблюдалось расхождение на одно, реже — на два разведения; иными словами, при анализе некоторых образцов удавалось обнаруживать десульфурирующих бактерий в десять или в сто раз больше. Речь, конечно, идет не о различной интенсивности роста этих бактерий, а о полном отсутствии их развития на элективной среде и хорошем росте на оптимальной среде. В склянках с последней быстро появлялся черный осадок, тогда как осадок в склянках с элективной средой оставался серовато-белый, как это видно на рис. 1 a, 1 b и 2. Эти результаты исследований наиболее существенны.

Следует остановиться на некоторых деталях. Некоторые образцы почвы содержали значительное число десульфурирующих бактерий. В хорошо удобренных почвах десульфурирующие бактерии обнаруживаются при посеве разведения 1 : 10 млрд. (опыты № 2 и № 3). Такое значительное содержание бактерий, восстанавливающих сульфаты, заслуживает внимания, так как обычно их рассматривают как обитателей главным образом грунтов водоемов и воды и, говоря о содержании их в почве, дают значительно более низкие цифры. В одном из опытов (опыт № 10) на оптимальной среде наблюдалось развитие бактерий, образующих зеленый пигмент и угнетающих десульфуризацию. Такое наблюдение было единственным, и развитие сопутствующей микрофло-

ры, наблюдавшейся постоянно на оптимальной среде, не мешало росту десульфурирующих бактерий. Развитие флуоресцирующих бактерий-антагонистов наблюдается не только на оптимальной, но и на элективной среде (табл. 2).

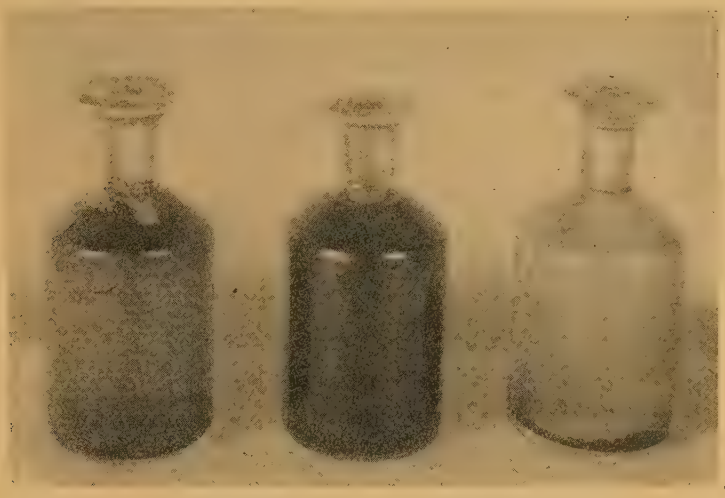


Рис. 1a. Посев почвы на оптимальную питательную среду. Восстановление сульфатов во всех трех склянках. Посев разведений 1/100, 1/1000, 1/10 000

Определение количества бактерий, вызывающих восстановление сульфатов несколько сложнее, чем аналогичные анализы на присутствие других физиологических групп бактерий. Иногда десульфурирующие бактерии не развиваются при посеве определенного разведения, тогда

Рис. 1b. Посев тех же разведений почвы на элективную питательную среду. Сульфаты восстановлены только в первой склянке. Возраст культур во всех случаях тридцать дней

как одновременный посев более низких и более высоких разведений дает развитие. Такие случаи наблюдались и в наших исследованиях, в частности, при посевах на оптимальную среду в опытах №№ 9, 19, 20, 23, 24 и при посевах на элективную среду в опытах №№ 6, 20 и 23.

Связано ли отсутствие роста с тем, что возбудители десульфуризации в силу несовершенства метода разведений вообще не попадают при посеве в среду или попавшие клетки не находят условий для своего размножения,— на эти вопросы могут ответить только дальнейшие исследования. Интересно, что при посеве разведений почвы при получении накопительных культур анаэробных целлюлозных или нитрифицирующих бактерий, как правило, такие «выпадения» не встречаются. Это позволяет высказать предположение, что отсутствие роста десульфурирующих бактерий объясняется не их отсутствием в посевном материале, а тем, что для клеток, попавших в среду, условия для размножения недостаточно благоприятны.

Рис. 2. Верхний ряд склянок с культурами десульфурирующих бактерий, полученных на оптимальной среде. Внизу посев тех же разведений почвы в склянки с элективной средой. В склянке справа нет восстановления сульфатов

Посевы на среды без сульфатов

На оптимальных средах развитие десульфурирующих бактерий начиналось раньше, чем на элективных средах, и, как указывалось выше, наблюдалось чаще. Оптимальные среды в отличие от элективных содержат белок дрожжевых клеток. Естественно возникал вопрос, не может ли разложение белка сопутствующими гнилостными бактериями привести к образованию сероводорода и, следовательно, к появлению черного осадка сернистого железа на дне склянки. Другими словами, следовало решить, зависит ли более частое образование черного осадка при употреблении оптимальной среды от деятельности десульфурирующих или гнилостных бактерий. Теоретически образование значительного количества сероводорода при добавлении к среде 1% дрожжевой воды мало вероятно, так как вместе с белком вносится ничтожное количество аминокислот, содержащих серу. С целью подтвердить этот вывод экспериментально были произведены следующие опыты. В склянки была налита среда, лишенная сульфатов, но содержащая достаточное количество источников энергии и питания для гнилостных бактерий. Состав среды следующий: хлористый аммоний 4,0 г; фосфорнокислый калий (двух-

замещенный) 1,0 г; хлористый магний 0,1 г; хлористый кальций 0,1 г; азотнокислое железо 0,5 г; молочнокислый кальций 4,5 г; дрожжевая вода (5%) 10,0 см³; дестиллированная вода 1000,0 см³; pH = 7,0.

Заражение склянок производилось из культур десульфурирующих бактерий, развивавшихся на оптимальной среде. В этих культурах имелись формы, сопутствующие бактериям, восстанавливающим сульфаты. Посевы делались с помощью небольшой платиновой петли, и переносилась только одна петля, так как при внесении значительного количества культуры вместе с посевным материалом могли попасть сульфаты, что, конечно, нежелательно. Естественно, что все реактивы, применявшиеся для приготовления питательной среды, проверялись на отсутствие в них сульфатов. Эти опыты выяснили, что при развитии сапрофитной микрофлоры в среде, содержащей 1% дрожжевой воды, сероводород не образуется. Попадающие при пересеве десульфурирующие бактерии также не образуют сероводорода, так как среда не содержит сульфатов. Во всех склянках осадок на дне совершенно не чернеет. Таким образом, почернение осадка в оптимальных средах зависит только от образования сероводорода, вызываемого десульфурирующими бактериями.

Развитие на средах с различным содержанием дрожжевой воды

Применявшаяся оптимальная питательная среда содержала 1% дрожжевой воды. Естественно, что такое количество дрожжевой воды не давало возможности сильно развиваться посторонней микрофлоре. С целью проверить, в какой степени может быть нарушена элективность среды, были произведены посевы

Таблица 2

Посев почвы и ила на среды, содержащие значительное количество дрожжевой воды. (Контрольные посевы на элективную среду)

№ опыта	Исследованные образцы	Среда Таусона + 30% дрожжевой воды																Среда Таусона + 6% дрожжевой воды																Среда Таусона (контроль)															
		Разведения																Разведения																Разведения															
		1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	1/100 000 000
1	Ил из озера Балхаш	+	+	+	+					+	+	+	+					+	+	+	+					+	+	+	+					+							
2	Почва из М. Камушек	+	+	+	+					+	+	+	+					+	+	+	+					+	+	+	+					+							
3	Почва из оранжереи																									*	*	+	+					+							
4	Почва из парка																									*	*	+	+					+							

* Развитие бактерий, образующих зеленый пигмент и угнетающих десульфурирующих бактерий.

образцов почвы и ила на среду Таусона, содержащую не 1%, а значительно большее количество дрожжевой воды. Контрольные посевы были сделаны на обычную среду Таусона. Результаты этих опытов приведены в табл. 2.

Мы видим, что в двух опытах (№ 1 и № 2) были получены одинаковые результаты как при посеве на среду, содержащую 30% или 6% дрожжевой воды, так и на элективную среду без дрожжевой воды. Однако в двух других опытах (№ 3 и № 4) на среде с 30% дрожжевой воды восстановления сульфатов вообще не наблюдалось, повидимому, благодаря быстрому росту сопутствующих бактерий, угнетающих десульфурирующих бактерий. При посеве этих же образцов почвы на элективную среду наблюдалось восстановление сульфатов даже при довольно больших разведениях. Отсутствие роста в первых двух разведениях, возможно, также связано с интенсивным развитием посторонней микрофлоры за счет органических веществ, внесенных с посевным материалом. Эти опыты говорят о том, что нарушение элективности среды, т. е. добавление к ней значительных количеств дрожжевой воды, может сделать ее малопригодной для роста десульфурирующих бактерий. Однако это наблюдается не во всех случаях, следовательно, дальнейшие исследования в этом направлении, возможно, позволят найти состав питательных сред, еще более благоприятных для бактерий, восстанавливающих сульфаты, чем оптимальная среда, применявшаяся в описанных выше опытах. Достаточно указать, что, заменив дрожжевую воду почвенной вытяжкой, мы также получали рост десульфурирующих бактерий чаще, чем при посевах на элективную среду.

Заключение

Проведенные исследования выяснили, что добавление белковых сред, в данном случае дрожжевой воды, к элективной среде позволяет обнаружить десульфурирующих бактерий там, где посев на обычные элективные среды не дает их роста. Такие оптимальные среды создают лучшие условия для жизнедеятельности возбудителей десульфуризации. Механизм такого благоприятного действия, повидимому, сложен. Во-первых, можно предполагать, что добавление дрожжевой воды улучшает состав питательной среды, обогащая последнюю дополнительными факторами питания, влияющими благоприятно на развитие десульфурирующих бактерий. Экспериментально этот вопрос может быть решен только после выяснения потребности бактерий, восстанавливающих сульфаты, в различных витаминах. Во-вторых, добавление белков нарушает принцип элективности среды, и в ней получают возможность развиваться посторонние сапрофитные бактерии. Размножение последних приводит к быстрому снижению потенциала, что, повидимому, крайне важно для начальных стадий роста десульфурирующих бактерий. Достаточно напомнить, что с этой целью рекомендуют добавлять к среде Na_2S или пропускать через среду сероводород. Далее не исключена возможность, что развивающиеся посторонние бактерии обогащают среду также витаминами и различными аминокислотами, образующимися при автолизе их клеток. Таким образом, ряд причин может лежать в основе более высоких качеств оптимальной среды. Вполне вероятно, что в дальнейшем, при отказе от необходимости соблюдать строгую элективность сред и после детального изучения более тонких особенностей физиологии питания бактерий, восстанавливающих сульфаты, будет разработан состав среды, которая даст лучшие результаты, чем среда, предлагаемая в этой статье.

Не следует, однако, забывать, что нарушение принципа элективности среды, обязательное при подборе оптимальных сред, может быть различным в исследованиях с различными группами. Так, в опытах с ана-

эробными целлюлозными бактериями оптимальной средой оказалась среда, содержащая 30—50% мясо-пептонного бульона. На этой среде развитие бактерий происходило гораздо лучше, чем на «строгой» элективной среде (Имшенецкий).

Совершенно иные результаты дали опыты с десульфурирующими бактериями. В этом случае добавление белковой среды в значительных количествах ухудшало свойства оптимальной среды. Повидимому, обильное развитие сопутствующих бактерий в культуре — явление, благоприятствующее росту целлюлозных бактерий, тогда как для накопительных культур десульфурирующих бактерий оно нежелательно. Следовательно, степень элективности среды при поисках состава оптимальной среды для бактерий, восстанавливающих сульфаты, должна быть нарушена лишь до известной степени.

Выводы

1. Элективная питательная среда для десульфурирующих бактерий менее пригодна для получения накопительных культур, чем оптимальная среда, содержащая дрожжевую воду.

2. Применяя оптимальную среду при анализе почвы или грунта водоемов, можно обнаружить присутствие десульфурирующих бактерий в посевном материале, заражение которым элективной среды не дает восстановления сульфатов.

Получено 23.V.1949

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. А. Оптимальные питательные среды для анаэробных целлюлозных бактерий. Микробиология, XVIII, 215, 1949.

О ПРОИСХОЖДЕНИИ СЕРОВОДОРОДА В ЧЕРНОМ МОРЕ

А. Е. Крисс и *Е. А. Рукина*

Вопрос о происхождении H_2S в Черном море казался решенным со времени опубликования гидрохимических исследований Севастопольской биологической станции [15]. Сероводород, заполняющий огромную толщу воды черноморского бассейна, согласно заключению гидрохимиков, произошел в большей своей массе (99,4—99,6%) путем восстановления сульфатов, и только 0,4—0,6% его могли образоваться при минерализации серосодержащих белковых соединений.

Выводы, эти, таким образом, поддерживая ранее высказанные аналогичные мнения Лебединцева [14], Зелинского [5] и Егунова [3], находились в несоответствии со взглядами Андрусова [1], который полагал, что сероводород в Черном море возник в результате «гниения органических веществ, скопляющихся на дне...» и «...восстановления сульфатов при процессе гниения и брожения тех же органических веществ». По Андрусову, «первоначальным источником для образования сероводорода были органические вещества, происшедшие вследствие гибели населявших прежде Понт солоноватоводных организмов, а в настоящее время они доставляются вместе с илом рек, волнами с континентальной платформы и преимущественно с поверхности моря в виде остатков планктонных организмов».

Знакомясь подробно с данными гидрохимических работ Севастопольской биологической станции, касающихся происхождения сероводорода, имевших исключительное влияние на все последующие сводки, обзоры и отдельные статьи, посвященные химии и биологии Черного моря, мы не могли не обратить внимания на несоответствие ряда основных положений, выдвинутых гидрохимиками станции, с приводимым ими фактическим материалом.

Вскоре нам представилась возможность исследовать в микробиологическом отношении глубины Черного моря. Естественно, возникло стремление более детально обследовать с микробиологической точки зрения некоторые стороны процесса круговорота серы, поскольку вышеприведенное заключение о происхождении сероводорода в Черном море построено не только на данных гидрохимии, но также и микробиологии.

Настоящая статья в сжатой форме излагает наши взгляды на происхождение сероводорода в Черном море, основанные на критическом рассмотрении гидрохимических работ Севастопольской биологической станции и собственных исследованиях.

О зависимости между содержанием сульфатов и концентрацией сероводорода в глубинах Черного моря

В первую очередь мы остановимся на утверждении, что имеется зависимость между содержанием сульфатов и концентрацией сероводорода в глубинах Черного моря. Как на первое доказательство возникновения сероводорода в Черном море за счет восстановления сульфатов морской воды указывается на якобы имеющееся уменьшение SO_4'' с глубины 500 м.

Обратимся для выяснения справедливости этого утверждения к таблице, которая содержит определения SO_4'' (в граммах на литр морской

воды) и сероводорода (в миллилитрах, выраженных при 0° и 760 мм давления) на шести глубоководных станциях, расположенных вдали от берегов (табл. 1).

При рассмотрении этой таблицы становится очевидным, что нарастание концентрации сероводорода обычно не сопровождается уменьшением количества сульфатов. До 500 м глубины на всех станциях увеличению H_2S в морской воде соответствует и повышение сульфатов. Это явление выражено также и на больших глубинах: ниже 500 м на станции № 150, ниже 1000 м — на станциях №№ 149, 151, 189, ниже 1500 м — на станции № 195, т. е. на большинстве станций. С другой стороны, на станции № 195 между горизонтами 1000 и 1500 м и на станции № 150 между горизонтами 1500 и 2000 м наблюдается одновременное уменьшение сероводорода и сульфатов. Вообще же, сопоставляя значения цифр, выражающих концентрации сероводорода и сульфатов в толще воды на различных станциях, трудно установить связь между приводимыми величинами. Простые подсчеты показывают отсутствие функциональной зависимости концентраций SO_4'' и H_2S в Черном море, особенно в том направлении, которое определяет достоверность предположения об образовании H_2S за счет разложения сульфатов в глубинах моря.

Трудно было не заметить этого, и, повидимому, поэтому были произведены, как указывается в работе, весьма произвольные вычисления. Было вычтено самое минимальное значение SO_4'' на данной станции, начиная с глубины 500 м, из самого максимального, и по разности определена соответствующая ей величина H_2S, причем оказалось, что... вычисленный сероводород на станциях №№ 149 и 150 много меньше наблюденного, на станциях №№ 151 и 195 значительно выше наблюденного и только на станции № 189 наблюденное количество H_2S равно 6,93, а вычисленное равно 7,1. Легко оценить после этого силу второго доказательства правильности гипотезы об образовании H_2S за счет сульфатов морской воды в Черном море, что будто бы вычисленное количество сероводорода по уменьшению сульфатов довольно близко стоит к наблюденному количеству.

Что же касается уменьшения количества сульфатов на некоторых глубинах, то само по себе это явление не имеет отношения к рассматриваемому вопросу. Однако следует заметить, что прогибы в кривой вертикального распределения иона SO_4'' позволяют сделать всевозможные заключения, в том числе и о методических погрешностях, но только не о закономерно идущем в глубинах процессе убывания сульфатов. В самом деле, как это видно из табл. 1, на станции № 149 количество сульфатов нарастает до глубины 500 м, на глубине 1000 м — падает, а затем опять следует подъем кривой. На станции № 150 нарастание наблюдается лишь до глубины 200 м, на глубине 300 м концентрация сульфатов — понижается, после чего наступает повышение до глубины 1500 м, сменяющееся неожиданно на глубине 2000 м новым падением кривой.

Нет необходимости анализировать данные о распределении сульфатов в водной толще на остальных станциях. Они усиливают впечатление о случайном характере цифр: из пяти станций, где определения сульфатов производились и на глубине 2000 м, на трех наблюдалось повышение сульфатов ко дну, а на двух — снижение их концентрации.

В попытке смягчить впечатление от того обстоятельства, что на глубинах свыше 1000—1500 м в большинстве случаев количество SO_4'' несколько повышается по сравнению с вышележащими слоями, было высказано мнение, что количество сульфатов глубже 1000 м ни в одном случае не превышает некоторого максимума на кривой распределения SO_4'' от поверхности до глубины 300—500 м. Оставляя в стороне вопрос о правомерности такого объяснения,— следует напомнить, что сероводород начинается с глубины 200 м,— укажем только, что все же

Таблица 1

Определение сульфатов и H_2S на шести глубоководных станциях (Данные Севастопольской биологической станции)

Глубина в м	Станция № 149		Станция № 150		Станция № 151		Станция № 152		Станция № 189		Станция № 195	
	SO_4''	H_2S	SO_4''	H_2S	SO_4''	H_2S	SO_4''	H_2S	SO_4''	H_2S	SO_4''	H_2S
0	1,2639	—	1,3410	—	1,3359	—	1,3601	—	1,3558	—	1,3996	—
50	1,3682	—	1,3765	—	1,3583	—	1,3831	—			1,4949	—
100	1,4344	—	1,5812	—	1,5521	—	—	—	1,5899	—	1,5692	—
200	1,6262	0,53	1,6652	0,58	1,5851	0,02	1,5923	0,41	1,6403	0,64	1,6196	0,77
300	1,6287	1,43	1,5940	1,66	1,6445	1,58	1,6578	1,62	1,6702	1,71	1,6925	1,78
500	1,6511	3,52	1,6281	3,75	1,6743	3,59	1,6610	3,72	—	3,90	1,6957	3,81
1 000	1,6262	5,87	1,6561	5,81	1,5992	5,61	1,5916	5,96	1,6395	6,05	1,6784	5,70
1 500	1,6494	5,97	1,6577	6,30			1,5866	6,05			1,6371	5,38
2 000	—	—	1,6329	5,84	1,6511	5,99	1,5833	6,09	1,6874	6,93	1,6487	5,68

такие случаи имели место, например, на станции № 149 разница в концентрации SO_4'' на глубинах 500 и 1500 м составляла лишь 0,0017 г на литр воды, и на станции № 89 количество сульфатов на глубине 2000 м превышало максимум от поверхности до глубины 300—500 м.

Рассмотрим еще два доказательства. Одно из них касается распределения CO_3'' и $Ca^{\cdot\cdot}$ в глубинах Черного моря. Согласно химическим определениям количество карбонатов и бикарбонатов ниже 200 м быстро растет с глубиной ко дну, а количество кальция начинает уменьшаться с глубины 1500 м. На этом основании выдвигается предположение, что повышенное содержание CO_3'' на больших глубинах определяется разложением сернокислого кальция углеродом органического вещества с образованием $CaHCO_3$ (до глубины 1500 м) или $CaCO_3$ (начиная с глубины 1500 м) и сероводорода. Почему углекислый кальций образуется, только начиная с глубины 1500 м, уводя на дно кальций из морской воды,— этому не дано объяснение, причем не учитывается, что осаждение карбоната кальция происходит в морях и в результате жизнедеятельности других физиологических групп микроорганизмов, например, денитрификаторов. Остается незамеченным также тот факт, что скорости нарастания H_2S и CO_3'' с глубиной, как это видно из табл. 2, не совпадают. Глубже 1000 м увеличение концентрации сероводорода не происходит столь интенсивно, как в вышележащих слоях, а ко дну количество его даже несколько снижается, между тем как кривая содержания CO_3'' и на больших глубинах резко идет вверх, достигая максимума в придонных областях моря. Нет никаких оснований, следовательно, для высказанного утверждения, что распределение кальция, сульфатов, карбонатов и сероводорода в глубинах Черного моря таково, какое требуется уравнением реакции восстановления сульфатов углеродом органического вещества.

Таблица 2

Определение H_2S и CO_3'' на различных глубинах Черного моря

(Данные Севастопольской биологической станции)

Глубина в м	H_2S в см³ (среднее значение)	Количество CO_3'' в граммах на литр воды					
		станция № 149	станция № 150	станция № 151	станция № 152	станция № 189	станция № 195
150	0,088			0,1020			
200	0,470	0,1019	0,1043		0,1059	0,1045	0,0992
300	1,480	0,1079	0,1072	0,1031	0,1065	0,1094	0,1069
500	3,779	0,1182	0,1133	0,1184	0,1102		0,1092
1 000	5,637	0,1250	0,1235	0,1211	0,1177	0,1162	0,1132
1 500	6,169	0,1304	0,1287		0,1249		0,1151
2 000	5,796	0,1333	0,1370	0,1355	0,1342	0,1386	0,1265

И последнее доказательство — это существование промежуточных продуктов восстановления сульфатов в зоне, расположенной ниже сероводородной границы. Поскольку на различных горизонтах водной толщи обнаружены SO_3'' и S_2O_3'', принимается, что присутствие этих соединений в глубинах указывает на процессы разложения сульфатов. Добавим от себя: и на процессы окисления H_2S.

В следующих сообщениях мы приведем данные о вертикальном распространении тионовокислых бактерий в Черном море, т. е. группы микроорганизмов, жизнедеятельность которых обусловливает процессы окисления серы и ее соединений с образованием в числе продуктов и веществ, найденных в толще черноморской воды: серноватистокислых и сернистокислых соединений. Поэтому нет сомнения, что наличие S_2O_3 и

SO_3 в глубинах Черного моря может быть обусловлено также и процессом окисления HS'.

Вот и все четыре доказательства, приводимые в пользу того, что сероводород в Черном море есть результат восстановления сульфатов углеродом органических веществ через промежуточные продукты до сульфидов и разложения последних угольной кислотой и бикарбонатами с выделением сероводорода. Легко убедиться при внимательном рассмотрении данных химических определений H_2S, SO_4'', CO_3'' и $Ca^{\cdot}$ в водной толще Черного моря, что эти доказательства носят характер утверждений, находящихся в противоречии с фактическим материалом.

О возникновении сероводорода в толще воды Черного моря

После работ Зелинского и Брусиловского [6], Исаченко [7] стала очевидной и для гидрохимиков микробиологическая основа процессов в Черном море, вызвавших накопление H_2S в его глубинах.

По мнению гидрохимиков [15], основная масса сероводорода в Черном море происходит в результате деятельности бактерий в толще морской воды. Что же касается восстановительных процессов, происходящих в илу, и их влияния на общее количество сероводорода, находящегося в водах Черного моря, то, например, Егунов [4] считает «гипотезу распространения H_2S со дна моря невероятной и неприемлемой» (стр. 85).

Естественно, нас заинтересовал вопрос, насколько справедливы эти утверждения. Следует напомнить, что поиски Исаченко и Егоровой [8, 9] десульфурирующих бактерий в Черном море, увенчавшиеся успехом, были ограничены илами. Вода с различных глубин на присутствие десульфурикаторов не исследовалась, и, следовательно, приведенные утверждения имели пока умозрительный характер.

Первые ориентировочные исследования распространения десульфурирующих микроорганизмов в Черном море нами были предприняты в 1946 г. Они были повторены в расширенном виде в 1948 г. На ряде станций в глубоководной части моря, бо́льшая часть которых располагалась на расстоянии более 100 км от берега в местах с глубинами свыше 2 000 м, брались пробы воды по горизонтам 1, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 500, 750, 1000, 1 250, 1 500, 1 750, 2 000 м. Присутствие десульфурирующих микроорганизмов определялось также в планктоносфере (Крисс и Рукина [13]) и в илах, о которых речь будет итти ниже. Взятые пробы воды и уловов планктона — уловы планктона собирались планктонной сеткой Джеди из газа № 38 из слоев воды: 0—10, 10—25, 25—50, 50—100, 100—200 и 200—300 м — тотчас же засевались в устроенной на судне лаборатории, в видоизмененную среду Баарса следующего состава: K_2HPO_4 — 0,5 г; NH_4Cl — 1,0 г; $CaSO_4$ — 1,0 г; $MgSO_4$ — 1,0 г; молочнокислый кальций — 3,5 г; вода — 1 000,0.

Эта среда наливалась примерно до половины объема пробирки или склянки и стерилизовалась. После засева пробы воды пробирки или склянки с засеянной средой выдерживались известное время для окисления находившегося в пробе воды сероводорода, затем в них вносилось несколько кристалликов соли Мора, и они доливались простерилизованной в колбах той же средой Баарса доверху, чтобы не оставлять пузырей воздуха между пробкой и поверхностью жидкости.

Поскольку исследования 1946 г. показали, что десульфурирующие микроорганизмы обнаруживались не во всех пробах воды даже при засеве больших количеств воды, посевы каждого образца воды в 1948 г. производились в количестве 1 мл, 5 мл и 25 мл, а из уловов планктона соответственно — 1 мл и 0,1 мл.

В табл. 3 приводятся данные исследований 1946 г. по распространению десульфурирующих микроорганизмов на различных глубинах Черного моря.

Таблица 3

Распространение десульфурирующих микроорганизмов в Черном море по данным 1946 г.

Глубина в м	Станция № 1	Станция № 3	Станция № 4
25	—		—
75			—*
100			+*
125			+*
150	—	—*	—
250	+	—*	—
1 000	+		
1 250	—*		
1 750	—*	+*	—*

Примечание. + наличие десульфурирующих микроорганизмов на данной глубине; — отсутствие этих микроорганизмов.

Звездочками отмечены данные Коппа [11], который проводил свои работы параллельно с нашими. Пробы воды на среды для десульфурирующих он засевал в количестве нескольких миллилитров.

Несмотря на сравнительно небольшое число исследованных проб, из табл. 3 можно видеть, что десульфурирующие микроорганизмы были встречены не во всех образцах воды, взятых с различных горизонтов. Бросается в глаза то обстоятельство, что в сероводородной области на больших глубинах, где, по мнению гидрохимиков, происходят процессы восстановления сульфатов в таком объеме, что они сказываются на количественном распределении сульфатов и карбонатов, не во всех образцах воды были обнаружены десульфурирующие микроорганизмы. На 1-й станции — на глубине 1 250 и 1 750 м и на 4-й станции — на глубине 1 750 м их определить не удалось. С другой стороны, десульфурикаторы были встречены в кислородной зоне, т. е. там, где, казалось, не происходит восстановление сульфатов (станция № 4, глубины 100 и 125 м).

Полученные результаты представляли большой интерес, и это побудило нас повторить исследования в 1948 г. в более широких масштабах: было увеличено число станций, они захватили отрезок моря длиной более 400 км, и пробы воды брались с большего числа горизонтов водной толщи. Помимо определений присутствия десульфурирующих микроорганизмов и получения их культур, по нашему предложению, Осницкая произвела исследования сульфатвосстанавливающей способности выделенных культур по количеству образуемого ими сероводорода. В табл. 4 сведены данные проведенных микробиологических и химических исследований.

Исследования 1948 г. подтвердили данные, полученные в 1946 г. Десульфурирующие микроорганизмы были встречены не во всех взятых пробах воды с различных горизонтов водной толщи (табл. 4). Из 92 проб воды 69 не содержали десульфурикаторов не только в объемах воды в 1 мл или 5 мл, но даже и в 25 мл — наблюдения велись в течение пяти месяцев. В положительных 23 случаях десульфурирующие микроорганизмы обнаруживались главным образом (13 проб из 23) при посевах больших количеств воды — 25 мл. То обстоятельство, что в 8 случаях посевы 5 мл дали положительный результат, между тем как склянки с посевами 25 мл оставались стерильными, лишь усиливает впечатление

Таблица 4

Места нахождения десульфурирующих микроорганизмов в водной толще Черного моря и активность выделенных культур

Глубина в м	Станция № 2	Станция № 4	Станция № 6	Станция № 7	Станция № 8	Станция № 11
1	—	25 (217,6)	—		—	—
25	—	—	—		—	—
50	—	—	25 (90,1)		—	—
75	—	—	—		—	—
100	5 (—)	—	—		—	—
125	—	—	—		—	25 (—)
150	25 (37,4)	—	—		25 (147,7)	—
175	—	25 (104,4)	25 (122,4)		—	—
200	—	5 (—)	—		—	—
225	5 (10,8)	—	—		5 (96,6)	
250	—	—	—		25	—
300	—					25 (153)
500		5 (—)	—		—	
750			—		—	
1 000		5 (—)	5 (—) и 25 (86,7)		—	
1 250		—	25 (6,12)		—	
1 500		5 (—)	—		5 (—)	
1 750		25 (6,8)	25 (221)		—	
2 000			—		—	
Слои	Планктоносфера			Планктоносфера		Планктоносфера
0—10	—			—		—
10—25	0,1 (—)			—		—
25—50	0,1 (21,8)			—		—
50—100	—			—		—
100—200	—			—		—
200—300	—			—		—

Примечание. Цифры 0,1; 5: 25 выражают объем пробы воды (в миллилитрах), в котором были обнаружены десульфурирующие микроорганизмы.

Цифры в скобках обозначают число миллиграммов на литр H_2S, образуемых данной культурой десульфурирующих микроорганизмов.

— отсутствие десульфурирующих микроорганизмов в 1,5 и 25 мл пробы воды с данного горизонта; (—) сероводород не обнаружен химическим методом; — — — — верхняя граница сероводорода.

о сравнительно малой заселенности глубин Черного моря микроорганизмами, способными в подходящих условиях к восстановлению сульфатов. Они встречаются далеко не в каждом миллилитре воды, т. е. малочисленны и к тому же не очень активны, что позволяет усумниться в их существенном влиянии на сульфаты, содержащиеся в воде глубин Черного моря. Характерно, что из 9 положительных случаев с посевами 5 мл воды в 7 случаях сероводород химическим методом обнаружить в пробирках с посевами не удалось, настолько малы были его количества. О развитии десульфурирующих микроорганизмов в этих пробирках можно было судить лишь по одному или нескольким мелким очагам почернения в осадке на дне пробирки.

При внимательном рассмотрении табл. 4 невольно приходишь к убеждению, что среди факторов, определяющих распространение десульфурирующих микроорганизмов в толще морской воды, значительную

роль играет органическое вещество. Нам не кажется случайным на фоне редких находок десульфурикаторов при столь массовом обследовании большой области Черного моря, что на всех без исключения станциях, в непосредственной близости к верхней границе сероводорода, были найдены эти организмы. Здесь, в промежуточном слое, содержавшем наряду с кислородом уже чувствительные для целого ряда планктонных организмов количества сероводорода, можно ожидать повышенное содержание органического вещества за счет гибели таких животных и растительных форм.

Что же касается глубин моря, начиная с 500 м, где предполагались активно протекающие микробиологические процессы восстановления сульфатов, то здесь частота находок десульфурирующих микроорганизмов не намного превышает найденное для кислородной зоны и планктоносферы; примечательно, что в двух уловах планктона из поверхностного слоя моря десульфурикаторов удалось обнаружить при посеве 0,1 мл. Мы полагаем, что в глубинах Черного моря, так же как и в кислородной зоне, распространение десульфурирующих микроорганизмов лимитируется органическим веществом. И возможно, что кажущийся гнездный характер распределения десульфурикаторов в водной массе моря определяется в таких случаях органическим веществом не в растворенной его форме, а в виде частиц, например разлагающихся остатков организмов, опускающихся на дно.

Итак, на основании данных о количественном содержании десульфурирующих микроорганизмов в водной массе Черного моря и их активности нельзя все количество сероводорода в Черном море отнести за счет восстановительной деятельности бактерий, разлагающих сульфаты в толще воды моря.

Об активности микробиологических процессов образования сероводорода на дне Черного моря

Кривая распределения сероводорода в Черном море имеет характерное течение. Примерно с глубины 150 м количество H_2S быстро нарастает до глубины 1 000 м с сотых долей кубического сантиметра до 5,6 $см^3$ в литре воды (табл. 2). Глубже, до 1 500 м, еще наблюдается некоторое увеличение концентрации H_2S — на 0,5 $см^3$ в литре, но затем в придонных областях содержание его снижается до уровня, имевшегося на глубине 1 000 м.

Первый отрезок кривой — от верхней границы H_2S до глубины 1 000 м — выражает собой взаимодействие сероводорода с кислородом на различных горизонтах водной толщи. Реальность такого взаимодействия вытекает из гипотезы Водяницкого [2] об обмене между поверхностными и глубинными слоями воды. Второй отрезок является почти прямой, показывая, что ниже 1 000 м и до дна содержание сероводорода в воде имеет примерно одну и ту же величину.

Этот характер распределения сероводорода в Черном море побудил нас обратить внимание также на микробное население в грунтах моря. В 1946 г. на большом удалении от берегов (свыше 100 км) удалось извлечь с помощью трубки Экмана колонки илов на 4 станциях, отстоящих одна от другой на 50 км, со следующих глубин: на 2-й станции — 2 164 м, на 3-й — 2 150 м, на 4-й — 2 100 м, на 5-й — 1 730 м. Со всеми предосторожностями были взяты поверхностные слои грунтов, которые исследовались на судне, а затем — вторично в Москве.

Уже первый посев илов на видоизмененную среду Баарса показал, что количество десульфурирующих микроорганизмов в илах сероводородной области, на максимальных глубинах черноморской впадины, очень велико. Они обнаруживались рано или поздно, от 5-го до 28-го дня в различных разведениях суспензии ила: 1 : 10 000; 1 : 100 000 и

даже 1 : 1 000 000 (табл. 5), т. е. насчитывались в сотнях тысяч на 1 г невысушенного ила.

Второй посев, уже в Москве, дал несколько меньшие числа: титры десульфурикаторов составляли 10^4, 10^5, а на 2-й станции — 10^1. Возможно, тут сказались сроки хранения илов, но у нас складывается впечатление, особенно после исследований 1948 г., что различные результаты также определяются невозможностью получить пробы для посева из одного и того же тонкого слоя грунта. Повидимому, максимальные количества десульфурирующих микроорганизмов встречаются в пограничном слое воды и грунта; глубже в илу их становится меньше.

В 1948 г., одновременно с большим числом проб из водной толщи были взяты колонки илов на 4-й, 7-й, 8-й и 11-й станциях. Эти станции располагались на большом расстоянии от берегов над глубинами свыше 2 000 м. Мы произвели посевы проб воды, взятых на станциях №№ 2, 4, 6, 8, 11 с горизонтов 1, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 500, 750, 1 000, 1 250, 1 500, 1 750, 2 000 м, а также поверхностных слоев илов с указанных выше станций не только на среду Баарса, но и на среду Рунова (вода морская — 1 000,0; K_2HPO_4 — 0,5; $FeSO_4$ — 0,2; $MnSO_4$ — 0,1; $ZnSO_4$ — 0,1; молочнокислый кальций — 10,0; 5% $(NH_4)_2SO_4$ по 2 капли в каждую пробирку) и среду Бейеринка (вода — 1 000,0; сера — 100,0; KNO_3 — 0,5; K_2HPO_4 — 0,2; Na_2CO_3 — 0,2; мел — 20,0).

Все огромное число посевов проб воды на среды Рунова и Бейеринка оказалось безрезультатным в отношении десульфурирующих микроорганизмов, между тем как на этих средах десульфурикаторы обнаруживались в разведениях илов 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} (табл. 5).

Очень характерны для обрисовки сложности метабиотических отношений в микробных ценозах на дне моря явления, которые разыгрались в среде Бейеринка, засеянной последовательными разведениями илов. Среда Бейеринка была разлита в пробирки высоким слоем, и после засевов они доливались той же средой доверху. Вначале мы наблюдали процесс денитрификации — в среде появились нитриты. Через некоторое время проявили свое действие тионовокислые денитрифицирующие микроорганизмы, окисляющие серу за счет кислорода азотнокислых и азотистокислых солей: стала положительной реакция на сульфаты. И, наконец, на сцену выступили десульфурирующие организмы: осадок на дне почернел, стал резко ощутимым запах сероводорода.

Таким образом, проведенные исследования сделали очевидным тот факт, что десульфурирующие микроорганизмы, в отличие от водной толщи, на дне моря находят благоприятные возможности для массового размножения, повидимому, благодаря сравнительному богатству органического вещества, а следовательно, там в результате жизнедеятельности огромного числа десульфурикаторов происходят в больших масштабах процессы восстановления сульфатов до сероводорода.

Но эти исследования илов одновременно показали и другое. Засеяв последовательными разведениями илов рыбо-пептонный бульон (РПБ), разлитый в пробирки по 5 мл, мы убедились в том, что на 3—5-й день размножение представителей группы так называемых гнилостных микроорганизмов произошло даже в пробирках с бульоном, куда было внесено разведение ила 1 : 1 000 000 или 1 : 10 000 000.

Сделанные наблюдения представляли большой интерес, если учесть, что нами засевались одни и те же разведения илов параллельно и одномоментно на среду Баарса и рыбо-пептонный бульон. Из этих опытов вытекало, что число гнилостных микроорганизмов в грунтах на 4-й и 5-й станциях не меньше, а на 2-й и 3-й даже больше, чем десульфурикаторов (табл. 5).

Далее выяснилось после прибавления на 10—13-й день соли Мора в бульон с посевами илов, что среди гнилостных микроорганизмов встре-

Таблица 5

Сравнительные определения в грунтах Черного моря микроорганизмов, образующих H_2S из белков и восстанавливающих сульфаты, и скорости образования ими сероводорода

Данные 1943 г.

Среда / Разведение ила	Станция № 2					Станция № 3					Станция № 4					Станция № 5				
	Баарс	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин	Баарс	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин	Баарс	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин	Баарс	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин
10^{-1}	5	5	13	4	4	4	4	12	7	7	4	4	12	7	7	3	3	11	7	7
10^{-2}	5	5	13	—	4	4	4	12	12	7	4	4	12	7	7	3	3	11	7	7
10^{-3}	15	5	13	—	—	4	4	—	—	7	14	4	12	7	7	3	3	11	7	7
10^{-4}	29	5	—	—	—	14	4	—	12	7	28	4	12	—	7	27	3	11	—	7
10^{-5}	—	5	—	—	—	28	4	—	—	60	28	4	—	12	7	27	3	—	60	7
10^{-6}	—	5	—	—	—	—	4	—	—	—	28	4	—	—	—	27	3	—	—	7

Данные 1948 г.

Среда / Разведение ила	Станция № 4								Станция № 7								Станция № 8								Станция № 11							
	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс альбумин, оп. 2	Рунов	Бейеринк	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс-альбумин, оп. 2	Рунов	Бейеринк	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 2	Рунов	Бейеринк	РПБ рост	РПБ H_2S	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс-альбумин, оп. 2	Рунов	Бейеринк
10^{-1}	4	10	18	18	4	4	51	97	4	10	61	14	4	16	51	97	4	10	13	13	22	16	51	97	4	10	12	12	16	4	51	97
10^{-2}	4	10	18	18	60	4	51	97	4	10	14	14	—	16	51	97	4	10	—	41	—	16	51	97	4	10	12	59	22	60	51	97
10^{-3}	4	10	—	32	107	16	51	—	4	10	19	42	—	16	—	—	4	10	—	—	—	60	51	97	4	10	—	15	60	—	51	97
10^{-4}	4	—	—	—	—	—	51	—	4	10	—	—	—	—	—	97	4	10	—	—	—	—	51	97	4	—	—	—	60	—	—	—
10^{-5}	4	—	—	—	—	—	51	—	4	10	—	—	—	16	—	97	4	10	—	—	—	—	—	97	—	—	—	—	—	—	—	97
10^{-6}	4	—	—	—	—	—	51	—	4	10	—	—	—	—	—	—	4	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-7}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. Цифры в графах указывают, на какой день была отмечена ясная реакция; — отсутствие реакции спустя 3—5 месяцев наблюдений.

чаются формы, разлагающие белки с образованием серосодержащих веществ, в том числе и сероводорода, дающих с железом соединения черного цвета. Почернение от соли Мора наблюдалось в пробирках с разведениями илов 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-6}, т. е. там, где еще сохранились на 10—13-й день летучие продукты превращений белковой серы, окрашивающиеся в соединении с железом в черный цвет.

Хотя данные этих опытов наталкивали на мысль о серьезном значении и гнилостных микроорганизмов в происхождении сероводорода в Черном море, хотя мы, казалось, получили представление даже о числе организмов в илу, разлагающих белки с образованием H_2S, все же возникали сомнения, вызванные тем обстоятельством, что условия опытов, в отличие от опытов с десульфурирующими микроорганизмами, не учитывали господствующей на дне Черного моря обстановки анаэробиоза.

Именно это обстоятельство побудило нас продолжить исследования и поставить следующие сравнительные опыты с илами, полученными на станциях в 1946 г., а затем в 1948 г.

Был приготовлен раствор солей по прописи видоизмененной среды Баарса: дестиллированная вода — 1 000,0; K_2HPO_4 — 0,5; NH_4Cl — 1,0; молочнокислый кальций — 3,5, однако — без сульфатов. Этот раствор делился на две части. К одной добавлялись сульфаты: $CaSO_4$ — 1,0; $MgSO_4$ — 1,0 из расчета на литр. К другой части — эквивалентное этому количеству сульфатов по сере количество альбумина; по расчету: 1 г $CaSO_4$ содержит 0,236 г серы, 1 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,13 г серы, в сумме 0,366 г серы. 1 г альбумина содержит 0,0143 г серы. Отсюда 2 г $CaSO_4 + MgSO_4 \cdot 7H_2O$ по содержанию серы соответствуют 26 г альбумина.

Обе модификации среды Баарса (назовем первую «Баарс-сульфаты», а вторую «Баарс-альбумин») разливались в пробирки примерно до половины объема. В отношении среды Баарса с альбумином применялись следующие предосторожности. В пробирку наливалось 10 мл этой среды, но с содержанием альбумина в расчете на весь объем пробирки. После кратковременного нагрева при 80—90° альбумин свертывался, а затем образовавшийся сгусток разбивался стеклянной палочкой на мелкие хлопья.

Далее обе модификации среды Баарса, разлитые по пробиркам, стерилизовались, в них производился посев соответствующими разведениями грунтов, после чего они доливались доверху той же средой и плотно закрывались простерилизованными резиновыми пробками. Спустя определенный срок температурной инкубации в каждой пробирке производилось количественное определение сероводорода. Данные химических определений сероводорода в проведенных сравнительных опытах приведены в табл. 6.

Ранее, при рассмотрении табл. 5, можно было убедиться в том, что почти во всех сравнительных опытах в одной и той же навеске ила число организмов, образующих H_2S на среде Баарса с альбумином, соответствовало числу или превышало число десульфурирующих микроорганизмов, образующих H_2S из сульфатов. Только в опыте 2-м с илом со станции № 11 титр микроорганизмов на среде Баарса с альбумином был меньше — 10^2, чем на среде Баарса с сульфатами — 10^4.

Обращало на себя внимание также то обстоятельство, что скорость образования сероводорода из сульфатов микроорганизмами илов значительно уступала скорости разложения альбумина с выделением H_2S (см. на табл. 5 время наступления ясной реакции на средах Баарса с альбумином и сульфатами).

По табл. 6 легко судить о том, что и количество сероводорода на среде Баарса с альбумином превышает количество H_2S, образовавшегося на среде Баарса с сульфатами. В большинстве случаев разница очень ощутима, наглядно демонстрируя степень активности микроорга-

Таблица 6

Сравнительные определения активности десульфурирующих микроорганизмов и микроорганизмов, образующих H_2S из белков, в грунтах Черного моря

Разведение ила \ Среда	Данные 1946 г.							
	Станция 2		Станция 3		Станция 4		Станция 5	
	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин	Баарс-сульфаты	Баарс-альбумин
10^{-1}	133	249	122	276	161	274	103	197
10^{-2}	—	179	173	205	247	76	173	179
10^{-3}	—	—	—	84	179	228	90	109
10^{-4}	—	—	50,4	141	—	223	—	179
10^{-5}	—	—	—	70	80	67	90	61
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	162

Разведение ила \ Среда	Данные 1948 г.															
	Станция № 4				Станция № 7				Станция № 8				Станция № 11			
	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс-альбумин, оп. 2	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс-альбумин, оп. 2	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс-альбумин, оп. 2	Баарс-сульфаты, оп. 1	Баарс-альбумин, оп. 1	Баарс-сульфаты, оп. 2	Баарс-альбумин, оп. 2
10^{-1}	30,6	98,6	30,6	146,2	—	127,5	85,0	159,8	21,9	129,2	—	105,4	40,8	85,0	17,0	166,6
10^{-2}	30,6	98,4	—	186,9	—	124,1	—	136,0	—	127,5	—	112,2	—	3,4	—	132,6
10^{-3}	—	95,2	—	44,5	64,6	78,2	—	189,8	—	—	—	95,2	—	66,3	—	—
10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-5}	—	—	—	—	—	—	—	85,0	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^{-7}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. Цифры в графах выражают число миллиграммов образовавшегося в течение 2 месяцев (в 1946 г.) и 5 месяцев (в 1948 г.) сероводорода в пересчете на 1 л; — отсутствие сероводорода.

низмов в грунтах, разлагающих белки в анаэробных условиях с образованием H_2S, по сравнению с десульфурирующими микроорганизмами в этих илах.

Итак, по числу, скорости образования сероводорода и количеству образуемого сероводорода, микроорганизмы, вызывающие превращения органической серы в анаэробных условиях, не уступают на дне моря сульфатвосстанавливающим микроорганизмам. Не говорит ли это о том, что в грунтах Черного моря процессы разложения органического вещества с выделением сероводорода за счет находящейся в нем серы играют не меньшую роль в происхождении сероводорода в глубинах Черного моря, чем процессы восстановления сульфатов?

И если до недавнего времени расчеты, построенные на имеющихся в глубинах соотношениях аммиака и сероводорода, казалось, требовали отрицательного ответа на этот вопрос, то в настоящее время после нахождения нами на дне Черного моря микроорганизмов, окисляющих аммиак, становится очевидным, что найденная концентрация аммиака в придонных областях есть остаток его, не вошедший в реакции взаимодействия, а следовательно, она не может отражать количественную сторону распада органического вещества на дне моря. Расчеты по аммиаку не могут воспроизвести всю картину сложных реакций превращения органического вещества на дне моря, осуществляемых микроорганизмами,— реакций, часть которых приводит к тому, что органическое вещество само по себе и как восстановитель сульфатов наполняет глубины Черного моря сероводородом.

Выводы

Проведенные исследования приводят к заключению, что основная масса сероводорода в Черном море происходит не в глубинах, а на дне моря. Микроорганизмы, вызывающие превращения органического вещества с образованием H_2S и процессы восстановления сульфатов, сравнительно малочисленны в водной толще, но густо заселяют поверхность дна моря. Судя по огромному числу и активности этих организмов в грунтах Черного моря, они находят там все условия для размножения, в том числе и необходимое им органическое вещество, которое они трансформируют в результате своей жизнедеятельности, обусловливая идущий по сей день процесс образования сероводорода за счет серы органических и неорганических соединений.

Разнообразен состав микроорганизмов на дне моря, принимающих участие в образовании сероводорода. Здесь встренаются представители различных систематических и физиологических групп микробов (Крисс, Рукина и Бирюзова [12]), попавших из поверхностных слоев и нашедших в илах благоприятные условия для своего развития. Среди них встречаются микробные формы, описанные Штурм [16, 17]: в поверхностных слоях, как предполагает автор, живущих аэробно, а на дне моря приспособившихся к использованию кислорода сульфатов с восстановлением их до сероводорода.

Нельзя разделить микробиологические процессы анаэробного разложения органического вещества с выделением H_2S и восстановления сульфатов. Нет никаких оснований приписывать исключительную роль в происхождении сероводорода в Черном море сульфатвосстанавливающей деятельности микроорганизмов. Оба эти процесса активно протекают на дне Черного моря, и нет пока данных для сколько-нибудь серьезного предпочтения одного из них. Предположение Андрусова о том, что сероводород в Черном море «есть сумма того сероводорода, который развивается при гниении органических веществ... плюс сероводород, образующийся, как конечный результат восстановления сульфатов», нашло свое подтверждение в виде отсутствия заметной разницы в величине слагаемых.

Если умножить наблюдающуюся активность микроорганизмов, населяющих грунты, в образовании сероводорода на время, то вряд ли будет признано невероятным заполнение глубин моря поднимающимся со дна сероводородом в концентрации около 6 $см^3$ на литр воды. Что же касается ссылок Егунова [4] на медленность диффузии сероводорода и необходимость в связи с этим колоссальных периодов времени для установления существующего режима вертикального распределения сероводорода в толще воды Черного моря, то, помимо высказанных Книповичем [10] соображений, «что в Черное море непрерывно вливается более соленая вода из Мраморного моря и... тем самым вызывает поднятие воды прежних придонных слоев» (стр. 175), необходимо еще учесть процессы перемешивания слоев воды, происходящие в силу действия ряда факторов во всей водной толще Черного моря (Водяницкий [2]). Эти причины, повидимому, играют основную роль в поднятии сероводорода со дна моря и распределении его в огромной массе воды Черного моря.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР, Москва
и
Севастопольская биологическая
станция Академии Наук СССР

Получено 12. II. 1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрусов Н. Проблемы дальнейшего изучения Черного моря и стран, его окружающих. II. О сероводородном брожении в Черном море. Зап. Росс. Акад. наук по физ.-мат. отд. VIII, т. I, стр. 1, 1894.
2. Водяницкий В. Основной водообмен и история формирования солености Черного моря. Тр. Севаст. биол. станции, 6, 386, 1948.
3. Егунов М. Био-анизотропные бассейны. Ежегодник по геологии и минералогии России, 4, 41, 1900—1901.
4. Егунов М. Диффузия некоторых газов и солей. Применение к биологии и технике. Изв. Одесского сельскохоз. ин-та, вып. I, стр. 81, 1925—1926.
5. Зелинский Н. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. Журн. Русск. физ.-хим. об-ва, 25, 299, 1893.
6. Зелинский Н. и Брусиловский Е. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. Отчеты о деятельн. Одесского бальнеолог. об-ва 1892—1893, вып. 5, Одесса, 1898; также в «Южнорусск. медиц. газете», № 18—19, 1893.
7. Исаченко Б. Sur la fermentation sulfhydrique dans la mer Noire. C. R., 178, № 26, 2204, 1924.
8. Исаченко Б. О бактериальных процессах в Азовском и Черном морях. Тр. I Всер. съезда гидрологов, 1925.
9. Исаченко Б. Микробиологические исследования морей СССР (1917—1937). Микробиология, VI, 964, 1937.
10. Книпович Н. Гидрологические исследования в Черном море. Тр. Азовско-Черноморской научно-промысловой экспедиции, вып. 10, 1932.
11. Копп Ф. К микробиологии Черного моря. Тр. Севаст. биол. станции, 6, 298, 1948.
12. Крисс А., Рукина Е. и Бирюзова В. Видовой состав микроорганизмов Черного моря. Тр. Севаст. биол. станции, 7, 1949.
13. Крисс А. и Рукина Е. Микробиология Черного моря. Распространение микроорганизмов в водной толще Черного моря. Микробиология, XVIII, 141, 1949.
14. Лебединцев А. Предварительный отчет о химических исследованиях Черного и Азовского морей летом 1891 года. Записки Новороссийского об-ва естествоиспытателей, 16, 149, 1892.
15. Тр. Особой зоолог. лаб. и Севаст. биол. станции АН СССР, сер. II, № 10, стр. 141, 1926.
16. Штурм Л. Морфологические и культуральные признаки факультативно-аэробных бактерий, восстанавливающих сульфаты. Микробиология, XVII, 334, 1948.
17. Штурм Л. Восстановление сульфатов факультативно-аэробными бактериями. Микробиология, XVII, 415, 1948.

СТРОЕНИЕ МОЛОДЫХ КЛЕТОК НЕСПОРОНОСНЫХ БАКТЕРИЙ

М. И. Бондаренко-Зозулина

В истории каждой специальности, в том числе и микробиологии, известны случаи, когда совершённая методическая ошибка порождает неправильную теорию, пользующуюся некоторое время признанием. В качестве примера можно указать на «открытие» ядра у бактерий, сделанное в недавнее время Robinow. Исследования этого автора стали широко известными, у него нашлись последователи, и на его данные нередко ссылаются. Распространению его идей способствовал выход книги Дюбо «Бактериальная клетка» [2], так как в ней в виде приложения помещена статья Robinow, в которой он также описывает ядра и хромозомы у бактерий. Взгляды Robinow встретили особое сочувствие со стороны цитогенетиков, так как отсутствие ядра у бактерий всегда вызывало априорные возражения представителей этой специальности. Несомненно, что в ближайшем будущем исследования Robinow будут признаны ошибочными и их постигнет забвение. Однако для этого необходимо экспериментальное опровержение основных его положений.

В настоящее время экспериментально доказано, что бактериальные клетки содержат тимонуклеиновую кислоту. Присутствие ядерного вещества было обнаружено Белозерским [1] в клетках неспороносных палочек, миксобактерий, сарцин и спирилл.

Что касается вопроса о ядре у бактерий, то основными теориями являются теория диффузного ядра (Guilliermond [11], Имшенецкий [3, 4, 5] Bütschli [10] и др.) и теории морфологически обособленного ядра (Robinow [12, 13], Пешков [7, 8]). В работах Robinow [12, 13] описываются ядра у Bact. coli, Proteus vulgaris и др. Этот исследователь после окрашивания препаратов по методу Гимза в течение 24 часов нашел, что окрашенное, крупное хроматиновое тельце, лежащее в центре клетки, делится. Одновременно с его делением у клетки возникает перетяжка, и клетка приобретает форму песочных часов. Затем две дочерние клетки разъединяются и каждая из них содержит по одному ядру. Работы Robinow [12, 13] были повторены и проверены затем другими исследователями (Пешков, Бирюзова), которые также обнаружили морфологически обособленные ядра у неспороносных бактерий.

К совершенно иным выводам пришел Имшенецкий [3, 4] на основании многолетних исследований в области цитологии бактерий. Этот автор считает, что дифференцированный в морфологическом отношении ядерный аппарат имеется лишь у некоторых миксобактерий. Другие бактерии, по наблюдениям Имшенецкого, не имеют ядра и хроматин в клетке распределен диффузно. Автор подходит к проблеме ядра у бактерий с эволюционной точки зрения, предполагая, что строение ядерного аппарата у разных групп бактерий неодинаково. Эволюция ядра у микроорганизмов идет от организмов, лишенных ядерных структур, к организмам, их имеющим. Истинные бактерии, в которых ядерное вещество находится в диффузном состоянии, являются следующим этапом эволюции по сравнению с первичными, повидимому лишенными ядерной субстанции организмами. Сравнительно небольшая и довольно резко отграни-

ченная группа микробов — миксобактерии — имеют обособленный ядерный аппарат.

Отмечая различное строение бактерий, Имшенецкий в то же время считает, что, независимо от их структуры, наследование свойств обеспечивается всей клеткой в целом.

Что касается данных Robinow [12, 13], Пешкова [7, 8] и др. о существовании морфологически обособленных ядер у Bact. coli, то Имшенецкий [5, 6] приходит к выводу, что эти авторы ошибочно принимают за ядра полярные зерна, отходящие в фиксированных препаратах от полюсов клетки в результате набухания клеток и зерен в краске Гимза. По данным Солнцевой [9], «ядра», описанные Бирюзовой у уксуснокислых бактерий, также представляют собой полярные зерна.

Наша работа посвящена анализу фактов, сообщенных в работах Robinow, а также Пешкова.

Экспериментальная часть

Методика

Методика наших экспериментальных исследований состояла в следующем. Из 18-часовых культур приготовлялась в стерильной водопроводной воде взвесь клеток Bact. coli, Bact. pyocyaneum, Bact. prodigiosum и Proteus vulgaris, выросших на МПА. Густота взвеси была равна эталону 1 млрд. клеток в 1 $см^3$. Затем 0,2 $см^3$ этой взвеси наносилось на поверхность МПА в чашках Петри, и последние помещались в термостат при температуре 37°. Через различные промежутки времени: 45 мин., 60 мин., 90 мин. и 180 мин. делались препараты отпечатки. Для этого вырезался небольшой квадратик агара и к нему прикладывалось покровное стекло. Приготовленные препараты фиксировались различными фиксаторами: 1) Карнуа (5—6 мин.); состав фиксатора: 3 части 96° спирта, 3 части хлороформа и 1 часть ледяной уксусной кислоты; 2) пары осмиевой кислоты (2—3 мин.); 3) абсолютный спирт (5 мин.); 4) пары формалина (2 мин.); 5) пары аммиака (5 мин.). После фиксации препараты окрашивались по Гимза или метиленовой синью. Окраска по Гимза в течение 10 мин. и параллельно в течение 24 часов при комнатной температуре. Часть препаратов окрашивалась 7 часов при температуре 37°. Краска приготовлялась следующим образом. Эозин ВА — 1 : 1 000 и азур — II — 1 : 1 000, приготовленные на дестиллированной воде (pH = 7,2), смешивались в такой пропорции: к 2 частям раствора эозина прибавлялось 6 частей дестиллированной воды (pH = 7,2) и при осторожном помешивании приливались 4 части раствора азура II. После окраски препараты дифференцировались 60° спиртом в течение 8 минут. Докрашивание протоплазмы производилось 0,25% раствором кислой краски лихтгрюн (10—30 секунд). После этого стекла без промывания высушивались фильтровальной бумагой и препараты заделывались в канадский бальзам.

Robinow [12, 13] и Пешков [7, 8] указывают, что препарат перед окраской необходимо подвергать гидролизу. Поэтому часть препаратов подвергалась гидролизу *N* HCl при 60° в течение 7 мин., а затем окрашивалась по Гимза. Окраска препарата метиленовой синью (0,01%) производилась в течение 5 мин.

Морфология клеток и полярных зерен

В исходной 18-часовой культуре бактерии имеют обычную, характерную для данного вида неспороносных бактерий величину и форму. При окраске по Гимза в течение 10 мин. или метиленовой синью в каждой клетке обнаруживаются два зерна, расположенные на полюсах.

На рис. 1 изображены клетки Bact. pyocyaneum, содержащие полярные зерна. Такая же микроскопическая картина получается при кратковременной окраске и других изучавшихся неспороносных бактерий — Bact. prodigiosum и Proteus vulgaris. Попадая на поверхность свежей питательной среды, клетки неспороносных бактерий начинают быстро увеличиваться в своих размерах за счет их набухания. Клетки впитывают воду, объем их увеличивается и довольно значительно. При этом у бактерий увеличивается главным образом ширина клетки. Необходимо отметить, что клетки обычно также утрачивают свою правильную цилиндрическую форму и слегка изгибаются. Набухание клеток происходит в течение определенного промежутка времени, затем (через 3—4 часа) они снова приобретают размеры, характерные для данного вида,

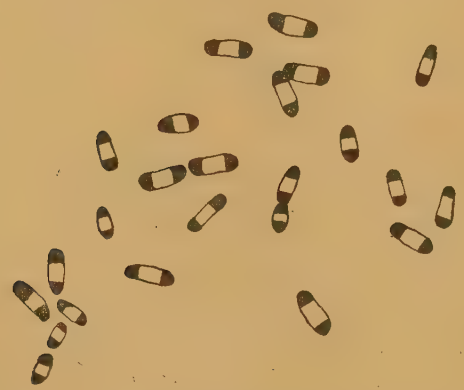


Рис. 1. Полярная зернистость в клетках Bact. pyocyaneum. 18-часовая культура. Фиксация Карнуа. Окраска по Гимза 24 часа

Рис. 2. Bact. coli. 45-минутная культура. После набухания на поверхности МПА все зерна остаются на полюсах. Фиксация Карнуа. Окраска метиленовой синью 5 минут

т. е. размеры, фигурирующие в определителях бактерий. Если окрасить эти набухшие клетки по Гимза в течение 10 минут или метиленовой синью, то в каждой клетке можно обнаружить те же полярные зерна, о которых говорилось выше. Они плотно прилегают к полюсам, не увеличены в своих размерах и интенсивно окрашиваются, как это изображено на рис. 2, где схематично нарисованы клетки Bact. coli, находившиеся 45 мин. на поверхности МПА.

Совершенно иная картина наблюдается при длительном окрашивании по Гимза набухших клеток. После 24-часового пребывания препаратов в краске Гимза клетки еще больше увеличиваются в своих размерах, и в результате этого набухания у фиксированных мертвых клеток полярные зерна смещаются с полюса и приближаются друг к другу. Если клетка короткая, то эти зерна сближаются быстрее, чем в удлиненных клетках. Полярные зерна, переместившиеся в центр клетки, иногда тесно прилегают друг к другу, и создается ложное впечатление, что в клетке имеется одно зерно (рис. 3, *а*). Эти смещенные полярные зерна и были приняты Robinow [12, 13], а также Пешковым [7, 8] за ядра. Не всегда удается получить препарат, в котором зерна во всех клетках сблизились настолько, что имеют характер одного тельца. Нередко в препарате видны самые различные микроскопические картины. Одни клетки содержат полярные зерна, только слегка отошедшие от полюсов, у других зерна находятся в различных стадиях процесса сближения, в третьих клетках полярные тельца еще совсем не отошли от полюсов и т. д. Так как в препарате всегда имеются клетки, соединенные по две, то обычно в

удлиненных раздутых двух клетках обнаруживается четыре зерна. Все это приводит к тому, что в препарате видны самые различные микроскопические картины, как это видно на рис. 3 и 4. Изучение этих картин облегчает понимание динамики морфологических изменений, приводящих к возникновению структур, ошибочно принимаемых за ядра.

Рис. 3. Смещение полярных зерен в клетках Proteus vulgaris в результате длительного пребывания клеток в краске Гимза. 60-минутная культура. Фиксация Карнуа. Окраска по Гимза 24 часа, *a* — короткие клетки с переместившимися в центр и тесно прилегающими друг к другу полярными зернами

Набухание клеток и зерен и перемещение последних в центр клетки — явление посмертное и вызывается длительным пребыванием клеток в краске Гимза. Эти изменения наблюдались закономерно у всех изучавшихся четырех видов неспороносных бактерий. Последнее позволяет утверждать, что такие посмертные изменения закономерны и могут быть вызваны у всех бактерий, имеющих полярные зерна.

Рис. 4. Набухшие клетки Bact. coli, в которых полярные зерна переместились в среднюю треть клетки. 60-минутная культура. Фиксация осмиевой кислотой. Окраска по Гимза 24 часа. *a* — клетка набухла, но зерна мало отошли от полюсов; *b* — две клетки с четырьмя зернами; *c* — полярные зерна в центре

Как уже указывалось, Robinow и Пешков рекомендуют перед окраской по Гимза подвергать клетки гидролизу в нагретой соляной кислоте. Проведенные нами исследования выяснили, что эта операция не является необходимой. Посмертное перемещение полярных зерен в клетке у неспороносных бактерий происходит одинаково как в препаратах, окрашиваемых непосредственно, так и после гидролиза соляной кислотой. Характер фиксатора также не оказывал влияния на этот феномен.

Наши опыты подтверждают данные Имшенецкого о том, что образования, принятые Robinow и Пешковым за ядра, являются в действительности полярными зернами. Об этом свидетельствует то обстоятельство, что наблюдаемые в исходной культуре полярные зерна, находящиеся на полюсах, под влиянием набухания в краске Гимза начинают смещаться к центру. Это смещение начинается уже после 6-часовой окраски по Гимза. Смещения не наблюдалось, как мы видели выше, при окраске метиленовой синью в течение 24 часов или 10-минутным окрашиванием смесью Гимза.

Очевидно, длительность действия краски при набухании клеток играет решающую роль при смещении зерен, так как окраска препаратов, пробывших 24 часа в воде, краской Гимза в течение 10 минут не вызывает смещения полярных зерен.

Выводы

1. Экспериментальная проверка исследований Robinow и Пешкова подтверждает присутствие хромофильных зерен в центре клеток Bact. coli, Bact. pyocyaneum, Bact. prodigiosum и Proteus vulgaris, которые обнаруживаются только после длительной окраски препаратов по Гимза. При кратковременной окраске по Гимза, так же как при употреблении других красок, эти образования в центре клетки не обнаруживаются.

2. Изучение микроскопических картин, наблюдаемых при набухании фиксированных клеток в краске Гимза, показывает, что полярные зерна при длительном воздействии краски набухают и начинают смещаться к центру.

3. Набухание клетки происходит неравномерно: сначала набухают концы клетки и полярные тельца, затем центральная часть клетки. Набухание полярных зерен также начинается с участков, обращенных к полюсу клеток.

4. Описанные Robinow, а вслед за ним Пешковым ядра у бактерий в действительности являются не ядрами, а полярными зернами, сблизившимися в результате набухания клеток при длительной окраске по Гимза.

5. Фиксаторы не оказывают влияния на характер набухания клетки и зерен, и при воздействии разнообразных фиксаторов микроскопическая картина получается одна и та же.

6. Таким образом, экспериментальные данные опровергают существование дифференцированного ядра у неспороносных бактерий, а работы Robinow и Пешкова подтверждают теорию диффузного ядра у бактерий.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР, Москва
и
Кафедра микробиологии
1-го Медицинского института
Москва

Получено 31. V. 1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А. О ядре у бактерий. Микробиология, XIII, вып. 1, 1944.
2. Дюбо Р. Бактериальная клетка. 1948.
3. Имшенецкий А. Строение бактерий, Москва, 1940.
4. Имшенецкий А. О ядерном аппарате бактерий. Микробиология, XIV, вып. 2, 1945.
5. Имшенецкий А. Несколько замечаний по поводу работы М. А. Пешкова «Кариология цикла развития бактерий». Микробиология, XV, вып. 3, 1946.
6. Имшенецкий А. Об артефактах, принятых за ядра у бактерий. Микробиология, т. XVII, вып. 3, 1948.
7. Пешков М. О природе «ядер» или так называемых нуклеоидов бактерий. Микробиология, т. XVI, вып. 5, 1947.
8. Пешков М. Кариология цикла развития бактерий Proteus vulgaris Hauser. Микробиология, т. XV, стр. 99, 1946.
9. Солнцева Л. О строении уксуснокислых бактерий. Микробиология, XVIII, 233, 1949.
10. Bütschli O. Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen. Leipzig, 1890.
11. Guilliermond A. Contribution à l'étude cytologique des Bacilles endosporés. Arch. Prot., 12, 9, 1908.
12. Robinow C. A study of the nuclear apparatus of Bacteria. Proc. Roy. Soc. London, 130, 299, 1942.
13. Robinow C. Cytological observation on Bacterium coli, Proteus vulgaris and various aerobic sporeforming bacteria with special reference to nuclear structures. J. Hyg., 43, 413, 1944.

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ К ПОТРЕБЛЕНИЮ АЗОТА РАЗЛИЧНЫХ АМИНОКИСЛОТ

С. А. Коновалов

Известно, что потребление дрожжевой клеткой аминокислоты осуществляется через процесс ее дезаминирования; освобождающийся при этом аммиак идет на синтез белков (Ehrlich [11]; Neubauer и Fromherz [14]; Буткевич [1]; Паршин [8] и др.). Невозможность потребления аминокислоты без предварительного ее дезаминирования подтверждается тем, что ассимиляция аминокислот всегда связана с процессом брожения, вернее с энергией, освобождающейся при брожении. Кроме того, экспериментально установлено, что отщепление аминогрупп, различно расположенных в молекулах аспарагина, аргинина и лизина, происходит неодновременно (Коновалов [7]). О непосредственном же усвоении дрожжами аминокислот на построение белка дрожжей имеются лишь отдельные предположительные указания (Залесский и Израильский [6]). Пути использования дрожжевой клеткой углеродистого остатка аминокислоты окончательно не установлены. По данным Ehrlich, углеродистый остаток не должен принимать участие в дальнейшем обмене веществ. Это логически приводит к отрицанию разницы в ценности различных аминокислот. В то же время отмечается, что различные аминокислоты неодинаковы по питательной ценности, поскольку азот их усваивается дрожжами в разных количествах.

Опыты сбраживания проводились на синтетических средах с добавлением различных химически чистых аминокислот или смеси производных аминокислот в виде пептона, дрожжевой воды, паточного сусла.

В опытах с пептоном начальная среда и бражка после их предварительного гидролиза 15% серной кислотой [1] исследовались на содержание отдельных аминокислот. При этом среды с пептоном и дрожжевой водой испытывались на содержание аминокислот до внесения в них сахара. В искусственной среде содержание аминокислот определялось путем расчета после предварительной проверки препарата на содержание в нем азота; в бражке аминокислоты определялись по методике, описанной в практических руководствах.

В опытах с искусственными средами последние составлялись из пяти аминокислот, а именно: из аргинина, тирозина, гликоколла, цистина и аспарагина. К сожалению, нам не удалось достать другие аминокислоты, отсутствие которых в среде, безусловно, повлияло на результаты опыта. Можно думать, что количество ассимилируемых дрожжами отдельных аминокислот превышало их содержание в дрожжевых клетках, так как их азот частично расходовался на биосинтез других аминокислот, недостающих в среде, но необходимых дрожжевой клетке.

Полученные результаты (табл. 1) прежде всего показывают, что азот различных аминокислот усваивался в неодинаковом количестве; потребление его колеблется в пределах 6,44—57,65% от общего количества азота, ассимилированного дрожжами за весь период брожения.

---

[1] Эта концентрация оказалась достаточной для полного гидролиза пептона, что было установлено экспериментально

Таблица 1

Ассимилирование азота различных аминокислот дрожжами, культивируемыми на синтетической среде, содержащей 4% тростникового сахара (мг в 70 мл)

Условия опыта	Содержание азота различных аминокислот до брожения					Содержание азота различных аминокислот после брожения					Усвоено дрожжами азота различных аминокислот к общему количеству азота, ассимилированному дрожжами					
	аргинина	тирозина	гликокола	цистина	аспарагина	аргинина	тирозина	гликокола	цистина	аспарагина	аргинина	тирозина	гликокола	цистина	аспарагина	усвоено общего азота
Брожение с аэрированием	6,75	9,79	8,35	1,18	7,17	5,50	5,39	4,64[1]	1,18	1,79	1,25	4,10	3,71[1]	0,00	5,38	14,44
Брожение без аэрирования	6,75	9,79	8,35	1,18	7,17	4,56	1,73	5,52[1]	0,28	7,17	2,19	8,06	2,83[1]	0,90	—	13,98

[1] Азот гликокола определен по разнице.

Особенно высокий процент потребления приходится на аминокислоту — тирозин.

Потребление азота различных аминокислот изменяется в зависимости от аэрации. Без аэрации усиливается потребление тирозина, гликоколла, аргинина и цистина; азот аспарагина в этих условиях не потребляется. При размножении дрожжей в условиях аэрирования сред азот аспарагина начинает потребляться, а азот цистина не усваивается.

В то же время известно, что дрожжи в состоянии полностью потреблять все вышеуказанные аминокислоты, когда они находятся в среде отдельно (Edlbacher и др. [10]; Bischop [9]).

Выше отмечалось, что отсутствующие в питательном растворе аминокислоты компенсируются другими, присутствующими в среде. Это подтверждается данными следующего опыта, где для брожения применялось паточное сусло. Патока по своему аминокислотному составу является неполноценным субстратом, в силу чего потребление азота осуществляется, как это видно из полученных данных (табл. 2), в основном за счет азота дикарбоновых аминокислот (на 56,8%) и азота лизина (на 15,9%) и составляет в общей сложности 72,7% от общего азота, ассимилированного дрожжами. Ясно, что эти аминокислоты были потреблены в значительно большем количестве, чем они содержатся в белке дрожжевой клетки.

В последующем опыте в качестве источника азота бралась дрожжевая вода, которая по содержанию аминокислот представляет собой более полноценный субстрат.

В данном опыте удалось проследить за потреблением только двух аминокислот: аргинина и гистидина. И в этом случае оказалось, что азот аргинина был усвоен в количестве 1,6 мг, или 10,4% от содержания общего азота дрожжей, а азот гистидина, соответственно, 0,2 мг, или

1,3% (табл. 3). Дрожжи усвоили азот указанных аминокислот приблизительно в таком количестве, которое соответствует его содержанию в дрожжевых клетках.

Таблица 2

Потребление дрожжами азота дикарбоновых кислот и лизина при сбраживании 10° Бал. паточного сусла (мг в 279 мл)

Формы азота	Содержание азота		Усвоено азота		% к общему азоту, усвоенному дрожжами
	до брожения	после брожения	мг	%	
Общий азот	368,	306,7	61,6	16,7	100
Дикарбоновые аминокислоты	57,4	22,4	35,0	61,2	56,8
Лизин	16,4	6,6	9,8	59,7	15,9

По данным других авторов (Lüers и Nowak [12]), белок пивных дрожжей (зимоказеин) содержит в своем составе аргинина, рассчитанного на его азот, в количестве 8,4%, а гистидина — 3,5% к общему азоту белка.

Таблица 3

Потребление азота аминокислоты при сбраживании 10% сахарного раствора с добавлением дрожжевой воды в качестве источника азотистого питания (мг в 100 мл)

Формы азота	Содержание азота		Усвоено азота		% к общему азоту, усвоенному дрожжами
	до брожения	после брожения	мг	%	
Общий азот	49,3	33,4	15,9	32,3	100
Аргинин	7,9	6,3	1,6	20,2	10,4
Гистидин	0,3	0,1	0,2	66,7	1,3

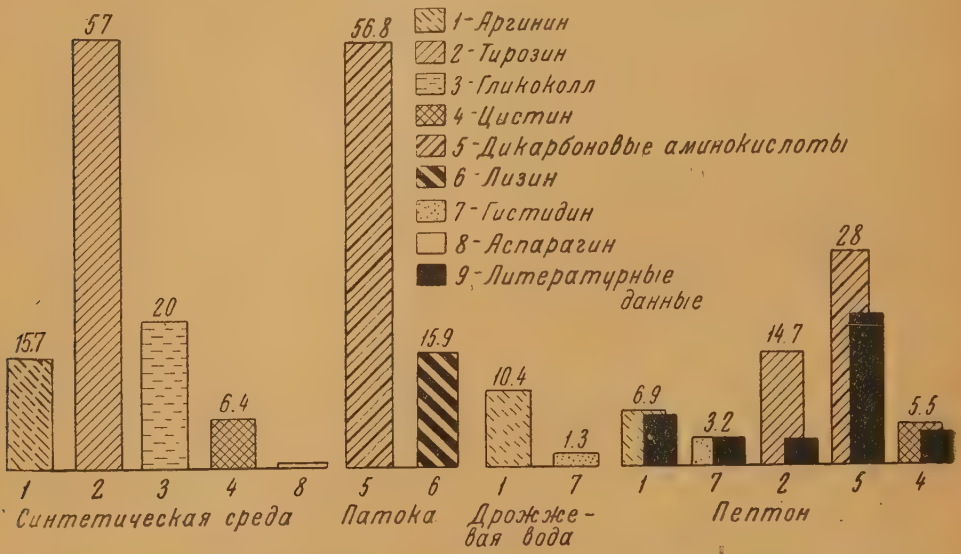
По данным Lüers и Vaidya [13], содержание аргинина, рассчитанного по азоту, в дрожжах, культивируемых на патоке с добавлением вытяжки из солодовых ростков и минерального азота, составляло 6,74% от общего их азота, а гистидина содержалось 3,15—7,30%. Такие колебания обусловливаются различным составом среды.

Для выяснения избирательной способности дрожжей к различным аминокислотам наиболее подходящим источником азота оказался пептон, представляющий собой полную смесь производных аминокислот.

Из табл. 4 следует, что дрожжами было усвоено азота аргинина 2,3 мг, что составляет 7,0% от общего ассимилированного азота. Гистидина было усвоено в наших опытах 1,0 мг, или 3,1% от всего усвоенного дрожжами азота. Данные, полученные нами, близки к средним результатам, имеющимся в литературе (см. выше).

Количество ассимилированного азота цистина и дикарбоновых кислот также соответствует их содержанию в белке дрожжей. Повышенное потребление азота наблюдается лишь для аминокислоты — тирозина, что находится в соответствии с результатами вышеприведенных опытов. Возможно, тирозин при этом требовался для восполнения недостающего фенилаланина. О возможности перехода фенилаланина в тирозин имеются указания в литературе.

Следовательно, дрожжевая клетка усваивает различные аминокислоты в таких количествах, которые соответствуют их содержанию в белке дрожжей (табл. 4, рисунок). Этот факт говорит о том, что для построения белков при размножении и росте дрожжей последним необходим не только азот, но также и углеродистый остаток аминокислот.



Потребление дрожжами азота различных аминокислот (процент к усвоенному азоту)

Только при условии признания дезаминированного остатка аминокислоты основным фактором, определяющим ее питательную ценность, легко объяснить положительное действие смеси аминокислот на физиологическое состояние дрожжевой клетки.

Таблица 4

Потребление азота различных аминокислот дрожжами, культивируемыми на среде, содержащей 3% пептона, 5% глюкозы и фосфорные соли (мг на 140 мл среды [1])

Название аминокислот	Содержание азота		Усвоено азота		% к общему азоту, усвоенному дрожжами
	до брожения	после брожения	мг	%	
Аргинин	10,2	7,9	2,3	22,4	7,0
Гистидин	1,0	Следы	1,0	ок. 100	3,1
Цистин	5,1	3,3	1,8	34,9	5,5
Тирозин	12,7	7,9	4,8	38,0	14,7
Дикарбоновые кислоты	15,4	6,2	9,2	59,6	28,0

[1] За весь период брожения дрожжами было усвоено 32,8 мг общего азота.

В свете вышесказанного находит объяснение и наличие «спиртового брожения аминокислот» (Ehrlich, [1]). Известно, что образование высших спиртов, называемых сивушным маслом, происходит в условиях, когда в среде содержится достаточное количество сахара, энергично сбраживаемого дрожжами. Промежуточные продукты сбраживаемого

сахара служат скелетом для синтеза аминокислот. Только при интенсивном образовании этих промежуточных продуктов брожения создается возможность для некоторой части аминокислот после их дезаминирования превратиться в соответствующий спирт, входящий в состав сивушного масла. Этими обстоятельствами и можно объяснить почти полное отсутствие сивушного масла в начальной стадии брожения, когда процесс размножения клеток преобладает над процессом превращения сахара в спирт, или в среде, содержащей низкую концентрацию сахара даже при интенсивном размножении дрожжей и потреблении ими азота (Залесская [2, 3]; Залесская и Коновалов [5]).

Полученные данные дают основание сделать следующие выводы.

1. Дрожжи при их культивировании в среде, содержащей смесь аминокислот или пептон, проявляют избирательную способность к различным аминокислотам, потребление азота которых соответствует их содержанию в белке дрожжей (табл. 4, рисунок). Повидимому, наряду с дезаминированием аминокислот и потреблением их азота идет одновременно обратный процесс реаминирования исходного вещества из продуктов распада — аммиака и дезаминированного остатка.

2. Признание дезаминированного остатка аминокислоты основным фактором, определяющим ее питательную ценность, позволяет рассматривать аминокислоты не только как источник азота, но одновременно и как источник углерода. Это логически приводит к признанию принципиальной разницы в ценности различных аминокислот.

Всесоюзный научно-исследовательский институт спиртовой промышленности
Москва

Получено 6. XII. 1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Буткевич В. С. Аммиак как продукт превращения белковых веществ плесневыми грибами и условия его образования. Сб., посв. К. А. Тимирязеву, 1916.
2. Залесская М. И. Получение повышенных выходов сивушного масла при спиртовом брожении. Микробиология, VI, 528, 1937.
3. Залесская М. И. Образование сивушного масла при спиртовом брожении. Микробиология, VII, 546, 1938.
4. Залесская М. И. Образование сивушного масла при спиртовом брожении. Обзор литературы. Микробиология, X, вып. 1, 1941.
5. Залесская М. И. и Коновалов С. А. Получение сивушного масла при сбраживании патоки. Микробиология, X, 535, 1941.
6. Залесский В. К. и Израильский В. Über den Eiweissaufbau in der Hefe. Ber. Deut. Bot. Ges., **32**, 472, 1914.
7. Коновалов С. А. Азотистое питание дрожжей. 1947 (Диссертация; Московский университет).
8. Паршин А. Н. Некоторые экспериментальные данные к обоснованию новой теории дезаминирования аминокислот в животной и растительной клетке. ДАН СССР, **58**, № 7, 1419, 1947.
9. Bischop L. R. The estimation of assimilable nitrogen in worts by yeast uptake and by wort analysis. J. Inst. Brewing, **53**, 129, 1947.
10. Edlbacher S., Becker M. u. Segesser A. Die Einwirkung von Hefe auf Arginin und Histidin. Z. Physiol. Chem., **255**, 53, 1938.
11. Ehrlich F. Ueber die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Ber. Chem. Ges., **40**, 1027, 1907.
12. Lüers H. und Nowak, цит. по Haehn H. Autolyse. Erg. Enzym., **5**, 117, 1936.
13. Lüers H. u. Vaidya M. Die Zusammensetzung des Hefeproteins in Abhängigkeit vom Náhrmedium. Z. Spiritusind. Nr. 44, 365; Nr. 45, 377, 1936.
14. Neubauer O. und Fromherz R. Ueber den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Z. Physiol. Chem., **70**, 326, 1911.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГРЕНЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ ЗАРАЖЕННЫХ ЖЕЛТУХОЙ БАБОЧЕК

Е. Т. Дикасова

Огромная вредоносность, вызываемая распространением желтухи, заставляет нас особенно остро ставить вопрос о разработке радикальных мер борьбы с этим заболеванием.

Из целого круга неизученных вопросов, касающихся природы вируса, практически важным представлялось установить пути распространения вируса желтухи на выкормках шелкопряда. Поэтому основным объектом проводимых исследований является грена как один из весьма вероятных путей распространения вируса желтухи в естественных условиях.

Ряд исследователей (Janisch [10], Letje [11], Bergold и Schamm [9]), считая, что внутреннее содержимое грены является свободным от вируса желтухи, рекомендуют в качестве радикального средства борьбы с желтухой поверхностное обеззараживание грены. Между тем достаточно большой объем проведенных нами исследований с применением различных методик приводит к убеждению о передаче желтухи с внутренним содержанием грены и к установлению значительного распространения вируса в естественных условиях в промышленной грене [4, 5, 6].

Результаты проведенных исследований вызвали необходимость в изыскании условий содержания тутового шелкопряда, обеспечивающих получение наиболее здоровой грены и изучение условий проникновения вируса желтухи во внутреннюю часть яиц.

В связи с утвердившимся в литературе взглядом, что желтуха не передается последующим поколениям через грену и что гусеницы, пораженные желтухой, гибнут до превращения их в бабочек, остался совершенно никем неосвещенным вопрос, имеющий большую практическую значимость, об условиях проникновения вируса желтухи в грену.

Для выяснения этого вопроса, прежде всего, потребовалась разработка метода, позволяющего обнаруживать полиэдры внутри яиц.

Ранее проведенными нами исследованиями по микроанализу экспериментально зараженных желтухой бабочек и отложенной ими грены установлено, что интенсивно инфицированные желтухой бабочки откладывают яйца, которые все оказываются зараженными желтухой (содержат в массовом количестве полиэдры). При менее интенсивном заражении родителей часть грены в кладе остается свободной от присутствия полиэдров [3].

Большая трудоемкость работ, связанных с изготовлением срезов грены, в которой можно было бы наблюдать неизменившиеся желтушные полиэдры, вызвала необходимость получения грены, интенсивно зараженной вирусом желтухи.

Исследованиям подверглась грена, полученная от интенсивно зараженных желтухой родителей.

Для получения грены, содержащей полиэдры, заражение желтухой шелкопряда производилось на стадии куколок, полученных от выкормки, ослабленной неблагоприятными условиями содержания; гусеницы кормились в июле жестким перезревшим листом при температуре 26—29° и относительной влажности воздуха 75—80%.

При этих условиях часть гусениц погибла преимущественно от желтухи, большинство же завило мелкие недовитые коконы.

Из коконов вынимались куколки, которые методом инъекции заражались желтухой на 5—6-й день после нимфальной линьки. Затем куколки помещались в термостат, в котором поддерживалась температура 29—30°, а относительная влажность воздуха 80—85%.

Значительная часть зараженных куколок погибла от желтухи на 5—6-й день после заражения, некоторая часть их превращалась в бабочек. Некоторые бабочки были так тяжело больны желтухой, что погибали в оболочках куколок, будучи не в состоянии выйти из них. Некоторые особи погибали через несколько часов после превращения их в бабочек. Большинство вышедших бабочек имело явные внешние признаки болезни. Они были мало подвижны, с трудом выходили из оболочек куколки, имели грязнобурый цвет и неохотно поддавались спариванию.

Незначительная часть вышедших бабочек имела сравнительно нормальный вид. Единственным внешним признаком заражения их оставалось бурое пятно на брюшке в месте прокола пастеровской пипеткой.

Все спарившиеся бабочки отсаживались в изоляционные мешочки для откладывания яиц. Не все изолированные бабочки были в состоянии отложить грену. Наиболее ослабленные из них погибали до откладывания грены. Часть более жизнеспособных бабочек жила два-три дня и откладывала небольшое количество щуплой и недоразвитой грены. Наиболее жизнеспособные особи откладывали по внешнему виду нормальную грену и сами умирали в обычные сроки.

Микроанализ трупов бабочек показал соответствие между жизнеспособностью бабочек и интенсивностью содержания в них полиэдров. Бабочки, содержащие в себе массовое число полиэдров, погибали в первые дни их жизни. Бабочки, свободные от полиэдров, погибали в обычные сроки.

Грена, полученная от бабочек, содержащих в себе полиэдры, исследовалась под микроскопом на присутствие в ней полиэдров. С целью устранения полиэдров с поверхности яиц вся грена перед изготовлением из нее препаратов обрабатывалась 2% раствором едкого натра в течение одной минуты с последующим одночасовым промыванием под струей водопроводной воды.

Такая обработка грены щелочью безусловно приводит к растворению могущих быть на поверхности грены полиэдров, так как при наблюдении за этим процессом под микроскопом растворение полиэдров происходило мгновенно.

С целью отбора грены, содержащей максимальное число полиэдров, производилось предварительное микроскопирование яиц, полученных от тяжело больных желтухой бабочек. Для этого от каждой кладки было взято по 3 яйца. Из каждого яйца изготовлялись препараты путем растирания их между двумя предметными стеклами и последующей окраской контрастным способом. Окрашивание препаратов выполнялось следующим способом: высушенный мазок на предметном стекле красился 5—10 секунд 1% водным раствором бриллиантовой зелени, после чего промывался под слабой струей водопроводной воды в течение двух-трех минут. Промывание препаратов во избежание смывания водой полиэдров производилось таким образом, что сам мазок ополаскивался только лишь стекающими каплями воды, а струя воды ударялась о стекло несколько выше мазка. Затем препараты красились в течение 5 минут 1% водным раствором пикриновой кислоты с последующим ополаскиванием водой. После этого препараты просушивались и просматривались под микроскопом с иммерсионным объективом.

Таким образом, микроскопированием были отобраны кладки грены, содержащие наибольшее число полиэдров.

В работах по приготовлению срезов яиц, содержащих полиэдры, испытывалось два способа фиксации грены. Первый способ состоял в нагревании яиц в жидкости Петрункевича в течение 10—12 минут при температуре 50° и последующем выдерживании их в этом же фиксаторе при комнатной температуре 23—24 часа [8]. При втором способе грена фиксировалась подогреванием в водопроводной воде при температуре 85° в течение 3 минут [7].

Исследования показали, что оба эти приема фиксации грены приводят к разбуханию полиэдров, имеющихся внутри яиц.

Отрицательные результаты испытания примененных нами способов фиксации грены привели к необходимости изыскания других приемов.

Так, нами делались попытки сокращения времени прогревания яиц. Однако опыт показал, что это тоже не приводит к цели. При прогревании яиц в меньший промежуток времени они не все бывают зафиксированными, а в зафиксированных яйцах происходит деформация полиэдров.

Последующие исследования показали, что в кладках грены, полученных от экспериментально зараженных желтухой бабочек и содержащих в массовом количестве полиэдры, не все яйца однородны. Яйца, содержащие большие скопления полиэдров, оказываются мертвыми, а находящиеся в них полиэдры уже успевают подвергнуться незначительным внутренним видоизменениям. Дело в том, что при хранении материала, содержащего полиэдры (трупы куколок, бабочек и гусениц, изолированная желтушная гемолимфа, как это теперь выяснилось, и грена) наблюдаются изменения во внутренней структуре полиэдров. В таких полиэдрах отмечается отслаивание оболочки, внутреннее содержимое принимает комковатую или зернистую структуру [2]. Такие изменившиеся полиэдры оказались значительно менее устойчивыми к действию на них температуры. Поэтому в последующих исследованиях делалась попытка изготовлять срезы таких яиц без предварительного прогревания их в фиксаторе. Применение фиксатора в холодном виде не привело к заметным изменениям структуры полиэдров.

Опыт работы с микроскопированием грены показал, что яйца, содержащие в себе большие скопления полиэдров, вскоре после откладывания их бабочками начинают подсыхать. Следовательно, в них происходит естественное уплотнение внутреннего содержимого. Для таких, несколько уплотнившихся естественным подсыханием яиц оказалась достаточной фиксация путем суточного выдерживания их в фиксаторе Петрункевича при комнатной температуре. Затем грена переносилась в дважды сменяемый 70° спирт. Для удаления сулемы, впитавшейся в грену с фиксатором, в первой порции применялся спирт с примесью иода. После двухсуточного выдерживания в спирте содержимое грены съеживается, вследствие чего довольно свободно отделяется от скорлупы. В более полных яйцах содержимое грены можно было вынуть целиком. В щуплой и недоразвитой грене вынуть целиком внутреннее содержимое почти не удавалось, а поэтому из таких яиц использовались для срезов отдельные участки грены с прилегающей к ним серозной оболочкой. (При заливке грены совместно с оболочкой внутреннее содержимое яйца не пропитывается парафином, а поэтому при резании ее на микротоме срезы выпадают из окружающего парафина.)

После отделения оболочки внутреннее содержимое грены переносилось в дважды сменяемый абсолютный спирт, общей продолжительностью на 30 минут.

Затем грена выдерживалась 1 час — 1 час 30 минут в дважды сменяемом бензоле. После этого, минуя этап пропитывания яиц парафином, непосредственно переносилась в формочки размером 0,5 × 0,5 см с остывающим (в момент образования поверхностной пленки) парафином.

Широко принятый в гистологической практике способ извлечения

парафина из срезов перед окраской их в наших исследованиях также не нашел применения. Дело в том, что обезвоживание срезов после окраски, перед заливкой в канадский бальзам связано с обработкой их спиртом. Применение же спирта после окраски приводит к извлечению краски из срезов, а отсюда к обесцвечиванию их. По этой причине в своих исследованиях мы не могли пользоваться наиболее простым способом приклеивания срезов к предметному стеклу путем подогревания предметных стекол с лежащими на них парафиновыми срезами, так как при этом срезы покрываются слоем парафина, который препятствует проникновению красок к исследуемым тканям, а отсюда устраняется возможность получения окрашенных срезов.

Полученные срезы приклеивались к предметным стеклам смесью яичного белка с глицерином, а после этого производилось окрашивание их гематоксилином, метиленовой синью, контрастным способом и Май-Грюнвальдом. Исследованиями установлено, что каждый из испытываемых методов окраски позволяет обнаруживать полиэдры в грене в достаточно четком виде. Наиболее отчетливо можно было наблюдать полиэдры в срезах, окрашенных контрастным способом.

У большинства просмотренных нами препаратов полиэдры были расположены непосредственно под серозной оболочкой яиц в виде огромных скоплений. Реже встречались срезы, в которых скопления были представлены меньшим числом полиэдров, и тогда они располагались в более глубоких слоях яйца.

Известно, что патологический процесс при желтухе приводит к формированию полиэдров в ядрах клеток. Появившись в ядре, они заполняют его, а затем и всю клетку. При разрушении значительного числа клеток полиэдры накапливаются в огромном количестве [1].

Следовательно, скопления полиэдров в грене нужно рассматривать как результат разрушенных в этом месте клеток, причем патологический процесс в исследуемом нами материале доходил до глубокого перерождения клеток, так как из сотни просмотренных нами срезов только в одном случае удалось наблюдать несколько погруженные в содержимое яйца шаровидные скопления полиэдров с сохранившимися контурами клеточной оболочки. Расположение больших скоплений полиэдров под серозной оболочкой указывает на перерождение значительного числа клеток в этих участках яиц.

Нужно полагать, что перерождение внутреннего содержимого яиц является причиной их нежизнеспособности.

Выводы

1. Исследованием грены, полученной от бабочек, интенсивно зараженных желтухой, обнаружены полиэдры внутри яиц.
2. У большинства яиц полиэдры в виде огромных скоплений расположены под серозной оболочкой, реже они представлены в меньшем числе и тогда несколько углублены во внутреннее содержимое яиц.
3. Исследование грены, отложенной интенсивно зараженными желтухой бабочками, показало, что яйца, содержащие в себе большие скопления полиэдров, нежизнеспособны и по истечении нескольких дней после откладывания их бабочками начинают подсыхать.
4. Нужно полагать, что глубокое перерождение внутреннего содержимого яиц и является причиной их нежизнеспособности.

Среднеазиатский научно-исследовательский
институт шелководства
Ташкент

Получено 13. XII. 1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Богоявленский К. К вопросу о гистопатологии желтухи шелковичного червя. Социалистическое шелководство, вып. 4, 1932.
2. Дикасова Е. Т. К вопросу о зараженности грены тутового шелкопряда. Тр. совещания комиссии шелководства ВАСХНИЛ. ОГИЗ — Сельхозгиз, Москва, 1947.
3. Дикасова Е. Т. Серодиагностика вируса желтухи тутового шелкопряда. Микробиология, XVII, № 2, 1948.
4. Дикасова Е. Т. Испытание возможности отбраковки грены, зараженной желтухой в процессе инкубации. Рефераты научно-иссл. работ Среднеазиатского научно-иссл. ин-та шелководства. Ташкент, 1947.
5. Дикасова Е. Т. Метод электрофореза в исследовании грены тутового шелкопряда на присутствие в ней вируса желтухи. Микробиология, XVIII, 67, 1949.
6. Дикасова Е. Т. Испытание влияния зараженности грены тутового шелкопряда желтухой на жизнеспособность гусениц. Рефераты научно-иссл. работ Среднеазиатского научно-иссл. ин-та шелководства, Ташкент, 1948.
7. Михайлов Е. И. Техника весеннего хранения грены в холодильниках. Тр. Ср.-аз. научно-иссл., ин-та шелковод., вып. XI. Изд. Комитета наук Узб.ССР, Ташкент, 1936.
8. Фролова С. Л. Цитология искусственного партеногенеза тутового шелкопряда. Биологический журн., т. IV, вып. 2, 1935.
9. Bergold G. und Schamm G. Biochemische Charakterisierung von Insektenviren. Biol. Ctbl., 62, H. 3—4, 1942.
10. Janisch E. Physiologische Grundlagen der Nonnenprognose. Anz. Schädlinsk, 12, 77, 1930.
11. Letje N. Das Gelbsuchtsproblem bei den Seidenraupen. Seidenbauforschung, 1, 1, 1939.

ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕАЗ НА ЯДЕРНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ПРИ ЖЕЛТУХЕ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Е. С. Залманзон

Существует обширная литература по изучению действия протеолитических ферментов на вирусы. Все литературные данные могут быть разбиты на три группы: 1) протеазы не влияют на инфекционность многих вирусов (не переваривают их) (Рыжков [1] и другие); 2) некоторые ферменты (трипсин, папаин, рибонуклеаза) образуют с отдельными вирусами неактивные комплексы, распадающиеся при разведении и нагревании (Товарницкий [3, 4, 5], Kleczkowski [6] и другие); 3) часть вирусов гидролизуется ферментами (Pfankuch и Kausche [8] и другие).

Большинство этих работ имело следующие методические неточности:

1) не всегда учитывалась возможность инактивирования вируса в условиях опыта, независимо от фермента;

2) о переваривании судили только по исчезновению активности вируса.

Указанные недостатки иногда приводили к противоречивым выводам; так, например, из работы Lojkin и Vinson [7] известно, что при pH = = 2,0—3,3 происходит инактивация вируса табачной мозаики и без добавления пепсина, а при более высоких pH вирус сохраняет свою инфекционность.

Однако Stanley [9], действуя на вирус табачной мозаики пепсином при различных pH, нашел, что длительная инкубация при pH = 3,0—4,0 приводит к инактивированию этого вируса, и объяснял это пептолизом. Kleczkowski [6] не подтвердил данных Stanley.

Ввиду приведенных методических недочетов и известных противоречий, мы решили еще раз изучить влияние ферментов на вирусы.

В качестве модели для изучения были взяты полиэдры (внутриядерные включения гиподермы, жировых и кровяных клеток больных желтухой гусениц тутового шелкопряда). Этот объект удобен тем, что о переваривании полиэдров можно было судить не только по потере ими инфекционности, но и морфологически. Имевшееся в литературе сообщение (Wahl [10]) о полном переваривании полиэдров солянокислым пепсином и устойчивости их к действию трипсина не могло быть признано достоверным, так как не учитывалась возможность инактивирования полиэдров при кислых pH.

Само собой разумеется, что следует строго различать переваривание ферментами активного вируса от переваривания денатурированного или вообще утратившего активность вируса.

Материал и методы

В опытах применялась взвесь полиэдров, тщательно отмытых от гемолимфы и тканей больных гусениц в глицерине или 30° спирте. В первом случае полиэдры были инфекционны, во втором — инактивированы длительным пребыванием в спирте; однако по устойчивости к различным химическим и физическим факторам они не различались и не были способны окрашиваться анилиновыми красками (из работы Тарасевич [2] известно, что полиэдры становятся восприимчивыми к окраске лишь

после глубоких изменений под действием различных факторов). Растворы ферментов готовились ex tempore при различных pH. Контролем служили буферные растворы (фосфатный, гликоколевый, раствор $NaHCO_3$ без добавления ферментов).

В маленькие пробирочки набиралось по 2 капли взвеси полиэдров, после чего в них добавлялись соответствующие буферные растворы с ферментами и без них. В каждую пробирочку прибавлялось по 1 капле толуола для консервации, и пробирки помещались в термостат при 37°. Папаин в опытах предварительно активировался в течение часа 0,4% раствором цистеина при 37°. Мазки из содержимого пробирочек брались через 10, 15, 20, 30, 40 минут, 1, 1½, 2, 2½, 6, 20 часов, через 2, 3, 4, 8 суток после начала опыта и окрашивались 5% раствором основного фуксина. Результаты опыта показаны в табл. 1.

Таблица 1

Действие пепсина, трипсина и папаина на полиэдры

Название реактива	pH среды	Отношение к окраске основным фуксином	Результат опыта
0,2% раствор HCl	2,0	+	Не переваривает
0,1% раствор пепсина в 0,2% HCl . .	2,0	+	Переваривает
Фосфатный буфер	8,03	—	Не переваривает
Раствор трипсина в фосфатном буфере	8,03	—	» »
Фосфатный буфер	6,8	—	» »
0,15% раствор папаина в фосфатном буфере	6,8	—	» »

Примечание. + окрашиваются; — не окрашиваются.

Из таблицы видно, что при pH = 2,0 полиэдры становятся восприимчивыми к окраске основным фуксином и перевариваются пепсином, а при pH = 6,8 и 8,03 трипсин, папаин не влияют на них. В то время как под действием растворов трипсина и папаина полиэдры остаются неизмененными и не окрашиваются основным фуксином (при pH = 6,8 и 8,03), 0,2% раствор HCl уже после 10-минутного пребывания в нем приводит к полному прокрашиванию полиэдров, которые несколько округляются, а затем контуры их причудливо изменяются. Под действием пепсина в 0,2% растворе HCl полиэдры разбухают, округляются, затем трескаются и начинают перевариваться с периферии: в то время как центральная часть полиэдра остается хорошо окрашенной, периферическая его часть становится расплывчатой, слабо окрашенной. Затем полиэдры распадаются на слабо окрашенные глыбки.

Поскольку полиэдры, помещенные в HCl, хорошо окрашивались фуксином (что говорило об их глубоком разрушении), можно было предположить, что они денатурируются кислотой и лишь после этого становятся восприимчивыми к пептическому протеолизу. Для подтверждения этого предположения нами были проделаны опыты как по изучению действия на полиэдры пепсина при более высоких pH (2,92; 3,34; 4,0) так и по исследованию воздействия трипсина и панкреатина на полиэдры, подвергавшиеся предварительной обработке (20-минутное кипячение на водяной бане, 20-часовое пребывание в 0,2% растворе HCl с последующим троекратным отмыванием от кислоты).

Постановка этих опытов не отличалась от описанной выше. Результаты их изображены в табл. 2.

Как видно из таблицы, при pH = 2,92 полиэдры быстро окрашиваются фуксином и перевариваются пепсином, при pH = 3,34 лишь после суточного пребывания в буферном растворе окрашивается центральная часть полиэдра, но он оказывается невосприимчивым к протеолизу, а

Таблица 2

Действие пепсина, трипсина и панкреатина на полиэдры при различных pH и после предварительного кипячения на водяной бане

Исходный материал	Название реактива	pH среды	Отношение к окраске	Перевариваемость
Свежие полиэдры	Гликоколевый буфер	2,92	+	—
» »	0,1% раствор пепсина	2,92	+	+
» »	Гликоколевый буфер	3,34	Через сутки окрашивается центральная часть	—
» »	0,1% раствор пепсина	3,34		—
» »	Гликоколевый буфер	4,0	—	—
» »	0,1% раствор пепсина	4,0	—	—
Фибрин	0,1% раствор пепсина	4,0		+
Полиэдры после 20-минутного кипячения	Вода	7,0	—	—
То же	Раствор трипсина или панкреатина	8,03	—	—
Полиэдры после суточного пребывания в 0,2% HCl	0,2% раствор HCl	2,0	+	—
То же	Раствор трипсина или панкреатина	8,03	+	+

Примечание. + положительные результаты; — отрицательные результаты

pH = 4,0 при котором не происходит прокрашивания полиэдра, не приводит к его перевариванию пепсином, хотя при всех этих pH пепсин сохраняет способность переваривать фибрин.

Предварительное кипячение на водяной бане не приводит к красимости полиэдров и оставляет их невосприимчивыми к триптическому протеолизу, в то время как полиэдры, находившиеся 20 часов в 0,2% растворе HCl, хорошо окрашиваются фуксином и быстро перевариваются трипсином и панкреатином (даже быстрее, чем пепсином). Если при переваривании пепсином даже на 5-е сутки оставались полиэдры в разных стадиях изменения, то трипсин полностью растворял их в течение полутора-двух суток. Суточное пребывание полиэдров в буферном растворе с pH = 2,92 вызывало подобный же эффект, а пребывание полиэдров при pH = 3,34 и 4,0 не делало их восприимчивыми к перевариванию трипсином и панкреатином.

Полиэдры, помещенные в раствор трипсина после 20-часового пребывания в кислоте, округляются, разбухают и превращаются в едва окрашенные тени.

После изучения морфологических изменений полиэдров под действием различных ферментов и условий среды интересно было проследить, как отражаются эти воздействия на инфекционности полиэдров, так как обычно о перевариваемости вирусов судили по утрате ими активности и, кроме того, нельзя было исключить возможность образования неактивных комплексов полиэдров с ферментами. Для этого были поставлены опыты по заражению гусениц полиэдрами, подвергавшимися перечисленным воздействиям.

Были взяты 8 коробок, в каждую из которых помещалось по 10 гусениц первого возраста. Гусеницы заражались однократным кормлением (лист смачивался взвесью полиэдров).

I коробка — полиэдры, находившиеся сутки в 0,2% HCl;

II коробка — осадок, полученный центрифугированием взвеси полиэдров после суточного пребывания в 0,1% растворе пепсина, который растворялся в 0,2% растворе HCl;

III коробка — фильтрат, декантированный с предыдущего осадка после центрифугирования;

IV коробка — полиэдры, находившиеся в растворе трипсина в 0,5% растворе $NaHCO_3$;

V коробка — полиэдры после суточного пребывания в 0,5% $NaHCO_3$;

VI коробка — полиэдры, находившиеся сутки в трипсине после суточного пребывания в 0,2% HCl;

VII коробка — необработанные полиэдры;

VIII коробка — незараженный контроль.

О причине гибели гусениц судили по наличию полиэдров в мазках из их гемолимфы или растертых тканей.

Результаты этого опыта показаны в табл. 3.

Таблица 3

Влияние ферментов на инфекционность полиэдров

Инфекционный материал	Погибло от желтухи	Погибло от других причин	Осталось в живых
Осадок взвеси полиэдров в пепсине	2	—	8
	—	3	7
Фильтрат взвеси полиэдров в пепсине	2	1	7
	1	3	6
Взвесь полиэдров в 0,2% HCl	—	1	9
	2	2	6
Взвесь полиэдров в трипсине после суточного пребывания в 0,2% HCl	—	4	6
Взвесь полиэдров в трипсине	5	1	4
Взвесь полиэдров в 0,5% $NaHCO_3$	4	—	6
Взвесь необработанных полиэдров	7	1	2
	5	5	0
Здоровый контроль	2	1	7
	—	3	7

Из данных табл. 3 можно заключить, что HCl оказывает определенное инактивирующее действие на полиэдры. Трипсин не влияет на их инфекционность.

Обсуждение результатов

Окрашиваемость полиэдров после пребывания в 0,2% HCl при 37° и значительное уменьшение их инфекционности при этом говорят о том, что кислота вызывает глубокие изменения в полиэдрах. Поскольку переваривание полиэдров пепсином наступает только при pH, вызывающих подобные явления, а при более высоких pH, достаточных для проявления протеолитической активности пепсина, но не вызывающих последующего окрашивания полиэдров, переваривания не наблюдается, следует признать, что полиэдры способны перевариваться пепсином лишь после предварительного глубокого изменения под действием кислоты. О том, что это изменение полиэдров должно быть достаточно велико, говорит тот факт, что трехлетнее пребывание в 30-градусном спирте, инактивирующее полиэдры, и 20-минутное кипячение их на водяной бане оказываются недостаточными для приобретения ими способности окрашиваться и гидролизоваться трипсином; только после обработки кислотой полиэдры становятся восприимчивыми к триптическому протеолизу.

Выводы

1. Папаин и трипсин при pH, оптимальных для их действия, неспособны переваривать полиэдры.
2. Пепсин переваривает полиэдры при низких pH (2,0—2,92), вызывающих их денатурацию, и неспособен переварить их при pH = = 3,34 и 4,0, хотя активность пепсина при этих pH сохранена.
3. Обработка полиэдров 0,2% HCl и гликоколевым буферным раствором с pH = 2,92 делает их восприимчивыми к протеолитическому воздействию пепсина и трипсина.
4. Суточное пребывание в 0,2% HCl снижает активность полиэдров.
5. Полиэдры, переваренные пепсином, мало инфекционны.
6. Трипсин не влияет на инфекционность нативных полиэдров.
7. Все работы по изучению действия протеолитических ферментов на вирусы, не учитывающие возможности их инактивации и денатурации в условиях опыта, не могут быть признаны убедительными.

Московский медицинский институт
Министерства здравоохранения
РСФСР

Получено 28. IV. 1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Рыжков В. Л. Основы учения о вирусных болезнях растений. Общее учение о вирусах, стр. 84—85, 1944.
2. Тарасевич Л. М. К морфологии полиэдров желтухи тутового шелкопряда. Микробиология, XIV, вып. 3, 1945.
3. Товарницкий В. И. Вирусопротеиновые комплексы. Биохимия, 10, вып. 2, 1945.
4. Товарницкий В. И. Некоторые комплексы биологически важных веществ. Успехи совр. биол., XXI, вып. 3, 1946.
5. Товарницкий В. И. и Шишкина О. И. Электрофоретические исследования вируса гриппа. Журн. микроб., эпидем. и иммунобиол., № 10—11, 1943.
6. Kleczkowski A. Combination of Potato virus X and Tobacco Mosaic Virus with Pepsin and Tripsin. Biochem. J., 38, No. 2, 1944.
7. Lojkin M. and Vinson C. G. Effect ot enzymes upon the infectivity of the virus of Tobacco mosaic. Boyce Thomson Institute for Plant Research, New York, 1933.
8. Pfankuch E. und Kausche A. Phosphatische Inaktivierung von pflanzlichen Viren. Biochem. Z., 301, 223, 1939.
9. Stanley W. M. Chemical studies on the virus of Tobacco mosaic. Phytopathology, Oct. 1934, pp. 1055, 1263.
10. Wahl B. Über die Polyederkrankheiten der Nonne, Ctbl. f. d. gesamte Forstwesen, 35 (164), 1909; 36 (193), 1910; 37 (247), 1911; 38 (355), 1912.

ПРОСТОЙ ТИП ФОТОНЕФЕЛОМЕТРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТНОСТИ В ПРОБИРКАХ

Б. В. Озимов

За последнее время количественное определение мутности с помощью фотоэлемента (фотонефелометрия) получило широкое распространение в бактериологических и микробиологических исследованиях [1, 2, 3].

Для нефелометрических измерений применяются различные типы фотоколориметров и фотонефелометров, которые не всегда удовлетворяют исследователей.

В данной работе дано описание простого фотонефелометра, сконструированного нами и испытанного на ряде определений. В нашем фотонефелометре определение светорассеяния производится непосредственно в пробирках, что значительно упрощает подготовку к анализу и дает возможность нефелометрировать биологические растворы, не нарушая их стерильности.

Простота конструкции пробирочного нефелометра, сравнительная точность, возможность нефелометрировать растворы непосредственно в пробирках — дают возможность предполагать, что пробирочный фотонефелометр найдет применение в биологических исследованиях.

Пробирочный фотонефелометр построен по дифференциальной схеме с двумя фотоэлементами. Общая схема, разрез и общий вид установки даны на рис. 1, 2, 3.

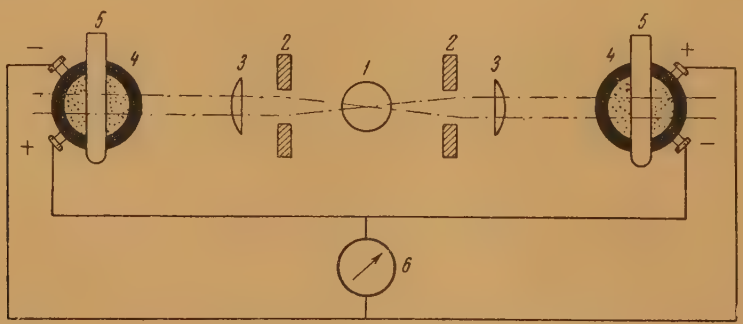


Рис. 1

Основными частями пробирочного нефелометра являются: осветитель *1*, ирис-диафрагмы *2*, линзы *3*, селеновые фотоэлементы *4*, пробирки *5* и стрелочный гальванометр *6*.

Внутри корпуса осветителя помещена точечная лампа типа «Osram» (5 в, 6 а), которая питается от батарей аккумуляторов. Эта лампа удобна тем, что она допускает работу с некоторым перекалом (7—8 в), что значительно повышает чувствительность фотонефелометра. В сеть питания включают реостат для обеспечения стабильности накала и вольтметр для регистрации напряжения (во все время работы с нефелометром напряжение должно быть стабильным).

С боков корпуса осветителя расположены линзы с ирис-диафрагмами (в нашем приборе мы использовали объективы от фотоаппарата «Фотокор»).

При включении лампы световой поток проходит через объективы и падает в двух противоположных направлениях на пробирки. Селеновые фотоэлементы К-10 ФАИ расположены под некоторым углом по отношению к световому потоку.

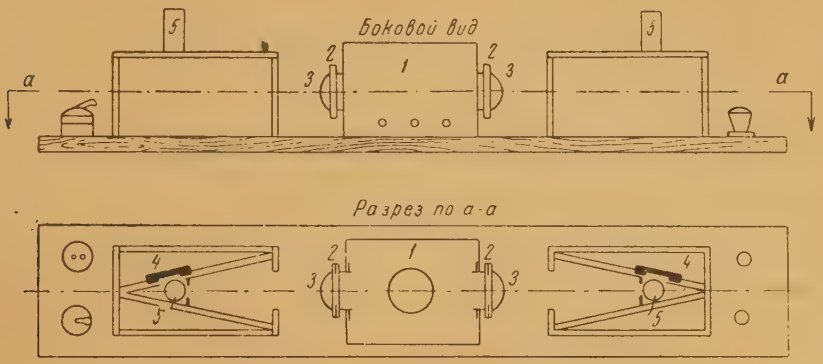


Рис. 2

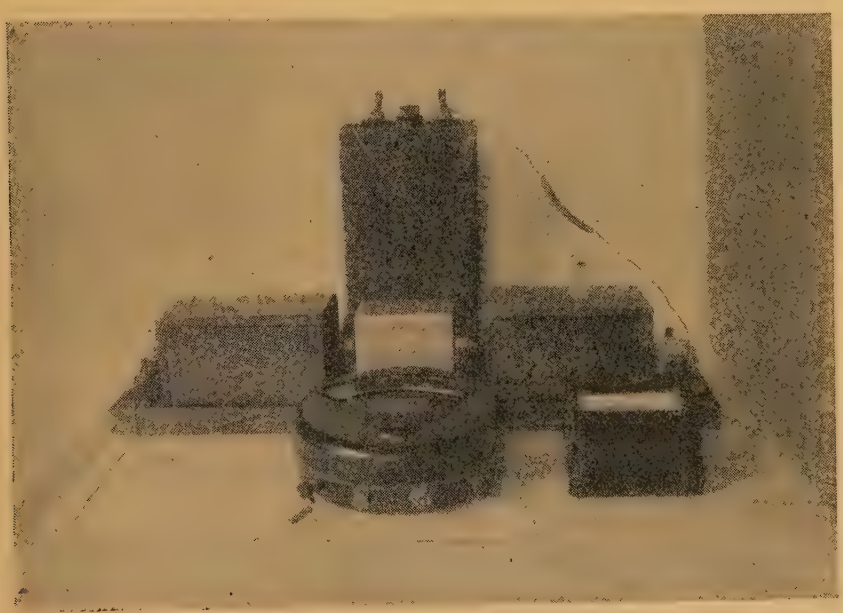


Рис. 3

Определение концентрации того или иного вещества производят так. В две пробирки одинакового диаметра (о подборе пробирок см. ниже) наливают чистой воды и помещают их в гнезда прибора. Включают источник света и гальванометр. С помощью диафрагм (путем регулировки световых потоков) устанавливают стрелку гальванометра на 0. Затем находят показание шкалы гальванометра для ряда стандартных растворов в пределах тех концентраций, в которых будут производить определение.

Для этого заменяют одну из пробирок с чистой водой пробиркой со стандартным раствором (начиная с меньшей концентрации) и отмечают

число делений на гальванометре. Так находят показания для всего ряда стандартов. Для каждого стандарта определение производят два-три раза и результаты заносят в таблицу.

Стандартный раствор колич. в мл	% или колич. мг	Отклонение стрелки гальванометра с чистым раствором i_0	Отклонение стрелки гальванометра со стандартным раствором i				Экстинкция (поглощение) $E = \lg i_0 - \lg i$
			1	2	3	среднее	
1	2	3	4	5	6	7	8

На основании полученных данных строят калибровочную кривую. Калибровочная кривая может быть построена двумя способами:

а) непосредственно по показанию гальванометра; тогда при построении кривой на графике по оси абсцисс наносят концентрацию, а по оси ординат — показания шкалы гальванометра (среднее значение i — графа 7);

б) путем определения экстинкции; тогда предварительно высчитывают экстинцию по формуле:

$$E = \lg i_0 - \lg i,$$

где i_0 — показание стрелки гальванометра с чистым растворителем, а i — показание со стандартным раствором. В этом случае при калибровочной кривой по оси абсцисс также наносят концентрацию, а по оси ординат экстинкцию (значение E — графа 8). После того как калибровочная кривая построена, можно приступить к определению концентрации исследуемых растворов.

Вначале проверяют нулевую точку прибора, для чего в оба гнезда ставят пробирки с чистой водой и устанавливают стрелку гальванометра на 0, как это было указано выше.

Затем одну пробирку заменяют исследуемым раствором. При этом компенсация фототоков нарушается и стрелка гальванометра будет отклоняться от нуля. Если калибровочная кривая была построена непосредственно по показанию гальванометра, то, зная отклонение стрелки, определяют количество (или процент) исследуемого вещества непосредственно по калибровочной кривой.

Если калибровочная кривая была построена на основании определения экстинкции, то предварительно определяют экстинкцию (см. графу 8).

Если нефелометрирование ведут со стерильными средами, которые нельзя переливать в пробирки нефелометра, то перед приготовлением сред подбирают серию пробирок с одинаковым светопоглощением (такие пробирки можно сразу ставить в гнездо нефелометра).

Пробирки должны обладать: 1) бесцветностью стекла, 2) одинаковой толщиной стенок, 3) одинаковым диаметром, 4) одинаковым светопоглощением.

Для подбора мы использовали обычные бактериологические пробирки, имеющие следующие размеры: длина — 120 мм, диаметр — 17 мм, объем — 18 мм.

Сначала сортируют пробирки по цветности стекла, отбирая наиболее прозрачные, без царапин и помутнений в стекле. Бесцветность стекла устанавливают на глаз. Отобранные пробирки сортируют дальше по толщине стенок и внешнему диаметру, путем измерения диаметра и толщины стенок с помощью штангель-циркуля. После такой отбраковки все пробирки устанавливают в штатив и в каждую из них наливают (точно из бюретки) по 10 мл воды. Отбирают все пробирки, в которых

уровень будет стоять на одной высоте. Последний подбор пробирок по одинаковому светопоглощению производят с помощью фотонефелометра.

В оба гнезда фотонефелометра помещают по пробирке с чистой водой и включают лампу осветителя. С помощью диафрагмы устанавливают стрелку гальванометра на 0. Вынимают одну пробирку (эту пробирку принимают за стандартную) из того гнезда, где будет помещена пробирка со стандартным или исследуемым раствором, и вставляют в гнездо новую пробирку с водой. Если пробирка обладает одинаковым светопоглощением с предыдущей, то стрелка гальванометра также будет стоять на 0. В случае различного светопоглощения стрелка гальванометра будет давать отклонение от 0. Так, по одинаковой величине светопоглощения отбирают все остальные пробирки. Подобранные вышеуказанным способом пробирки могут употребляться для нефелометрического анализа.

При работе с пробирочным нефелометром мы употребляли гальванометр Ленинградского университета тип С IV на 100 делений (1 деление $= 0{,}11 \cdot 10^{-6}$ а).

Ленинградский институт
холодильной и молочной промышленности

Получено 30. X. 1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Автономова Е. С. и Стесселъ Т. А. Nephelometrische Methode zur Bestimmung der Anzahle der Mikrobenleiber in bakteriellen Suspensionen mit Hilfe einer Photozelle. Biochem. Z., **274**, 220, 1934.
2. Андреев Н. Н. и Раевский А. С. Опыт применения определения светорассеяния с помощью фотоэлемента для изучения дифтерийных токсинов. Микробиологический журнал, 1, 3, 1929.
3. Смирнова А. Э. Быстрый метод контроля над нарастанием дрожжевой массы. Микробиология, XVII, 171, 1948.

ПИПЕТКА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУР ИЗ ОДНОЙ КЛЕТКИ

Л. И. Комарова

При выделении культур из одной клетки капельным методом питательная среда с микроорганизмами обычно наносится на стекло при помощи платиновой петли или чертежного пера. При этом основным неудобством является неравномерная величина капель, благодаря чему число клеток в различных каплях сильно вариирует. При прокаливании чертежного пера, кроме того, часто образуется окалина, которая, попадая в среду, затрудняет просмотр содержимого капель под микроскопом.

Для устранения этих недостатков мной совместно с мастером Стрижаковым были сделаны и проверены специальные пипетки, которые значительно облегчают работу по выделению микроорганизмов из одной клетки.

Изготовление этих пипеток не сложно, и каждый микробиолог (а тем боле стеклодув) может сам их легко приготовить.

Рис. 1. Положение пипетки при шлифовании (натуральная величина)

Рис. 2. Нижний конец пипетки (увеличенная схема)

Описание пипетки

Пипетка представляет собой обыкновенную пипетку из толстостенного стекла. Стеклянные трубки, которые мы брали для изготовления пипеток, имели внешний диаметр около 6 мм, толщину стенок от 2 до 2,5 мм и диаметр внутреннего сечения от 1 до 2 мм.

Верхний конец пипетки оплавляется на пламени горелки и закрывается ватой, как это обычно делается при микробиологической работе. Нижний конец пипетки оттягивается до капилляра таким образом, чтобы внутреннее сечение выходного отверстия было возможно меньшего диаметра (около 0,05 мм).

После оттягивания капилляра конец его отрезается и отшлифовывается при вертикальном положении пипетки на тонком шлифовальном камне (рис. 1).

Контроль за величиной отверстия во время изготовления пипеток мы производили при помощи нанесения пробных капель на стекло и добивались той величины капель, которая была желательна в дальнейшей работе (0,2—0,4 мм в диаметре).

Для получения более мелких капель (0,1—0,2 мм в диаметре) конец пипетки шлифуется, кроме того, конусообразно с боков с тем, чтобы диаметр внешнего сечения конца пипетки был не на много больше диа-

метра внутреннего его сечения (рис. 2). Чем меньше разница в величине внутреннего и внешнего диаметров на конце пипетки, тем меньше диаметр наносимой капли.

Представляется удобным иметь несколько категорий пипеток, дающих капли различной величины. В этом случае подбор разведения для культуры облегчается тем, что при наличии в капле нескольких клеток не делается новое разведение, а используется пипетка, дающая более мелкие капли, и наоборот.

Употребление пипетки

Готовые пипетки завертываются в бумагу и стерилизуются сухим жаром, чтобы мы всегда имели под рукой нужное число стерильных пипеток.

При выделении культур из одной клетки в пипетку ртом насасывается питательная среда с микроорганизмами. Затем при помощи этой пипетки наносятся капли на покровное стекло, для чего надо кончиком пипетки легко касаться покровного стекла. Выдувания при этом применять ни в коем случае не нужно.

После нанесения капель на покровное стекло последнее опрокидывается на предметное стекло с луночкой, вокруг которой наносится вазелин, как это обычно делается.

После того как на стекло нанесены капли, пипетки опускаются в стакан с водой во избежание высыхания питательной среды на стенках капилляра. На дно стакана хорошо положить плоскую резиновую пластинку во избежание обламывания тонких шлифованных концов пипетки.

Для нанесения капель на следующие стекла каждый раз берется новая стерильная пипетка. Таким образом, имея в распоряжении 20—30 пипеток, можно производить массовое выделение культур из одной клетки, на что потребуется всего несколько часов.

Ничтожная величина капель позволяет капельным методом выделять культуры из одной клетки мелких микроорганизмов (бактерий), так как в маленькой капле облегчается тщательный просмотр её содержимого при большом увеличении.

После употребления пипетки должны быть тщательно промыты водой. При промывании пипеток для выдувания воды из пипетки удобно пользоваться резиновой грушей.

Выводы

1. Предложена пипетка, предназначенная для нанесения капель при выделении культур из одной клетки.
2. Пипетка дает очень маленькие (диаметром около 0,2 мм) одинаковые по величине капли, благодаря чему работа по выделению культур из одной клетки существенно облегчается.
3. Пипетка делается из трубок толстостенного стекла и может быть приготовлена самим микробиологом.
4. При наличии 20—30 стерильных пипеток можно производить массовое выделение культур из одной клетки.
5. Данная пипетка особенно рекомендуется для выделения мелких микроорганизмов, в частности бактерий.

Получено 20.II 1949

Всесоюзный
научно-исследовательский
институт спиртовой промышленности
Москва

МИКОРИЗЫ И СТЕПНОЕ ЛЕСОРАЗВЕДЕНИЕ

(Обзор)

Д. М. Новогрудский

Сожительства грибов и корней высших растений, называемые микоризами, впервые открыты русским ученым Каменским [8]. В настоящее время микоризы нельзя рассматривать как совершенно обособленное явление. Экто- и эндотрофные микоризы тесно примыкают к проявлениям ризосферной микрофлоры [12] и представляют ряд переходов от типичных паразитических к истинно симбиотическим взаимоотношениям [8]. С каждым годом выясняется все более широкое распространение микориз. По Rayner и Neilson Jones [17], около 80% всех цветковых растений являются микоризными. Вильямс [3] принимал численность микоризных растений до 90%. По Magrou [14], все многолетние растения без исключения являются микоризными. Микоризы установлены у большинства лесных пород (сосна, ель, пихта, лиственница, граб, дуб, бук, каштан, береза, осина, липа и др.). О физиологической роли микориз древесных пород высказывались различные точки зрения. Одни подчеркивали безразличный или вредный характер микоризного гриба для высшего растения (Каменский). Другие, наоборот, считали микоризу полезной для высшего растения и необходимой для его нормального питания (Вильямс, Высоцкий). Повидимому, каждая из этих точек зрения в известной мере верна. В зависимости от комплекса сопутствующих условий микоризы могут быть иногда вредны, безразличны или полезны для высшего растения. Микоризы представляют большой теоретический и практический интерес, и им посвящена обширная литература (обзоры [12, 19]).

Вопрос о роли микориз в разведении древесных пород в степных, извечно безлесных районах впервые поставлен в 1902 г. известным русским почвоведом и знатоком степного лесоразведения Высоцким [4]. Он первый установил, что, помимо прямых и косвенных последствий сухости климата, в степных районах неблагоприятные условия для роста ряда лесных пород создаются вследствие отсутствия в степных почвах специфических микоризных грибов. К этим идеям Высоцкий впоследствии много раз возвращался [5, 6, 9], и после него они были восприняты английскими и американскими исследователями. Вопрос о роли микориз в степном лесоразведении подробно разработан в отношении дуба и сосны.

Микориза и развитие сеянцев дуба

Грибным компонентом дубовой микоризы могут быть различные виды грибниц (Boletus speciosus и др.). В питомниках и степных дубовых насаждениях УССР встречаются два вида микоризы: светлосерая и серо-желтая; последняя встречается реже. Микориза дуба относится к типу экто-эндотрофной. В почве безлесной степи микоризные грибы дуба отсутствуют. Имеющиеся указания [1], что они удовлетворительно развиваются при pH почв от 5,8 до 6,2 и уже угнетаются при pH 6,8, другими авторами отрицаются [10], и вопрос об отношении этих грибов к pH почвы остается неясным. Когда в степи впервые выращивают дуб, микориза у сеянцев, как правило, не образуется (если только желуди, служащие для посева, не заражены почвой, содержащей дубовый мико-

ризный гриб). Результатом безмикоризного развития является массовая гибель дубовых сеянцев, достигающая на втором году в питомниках до 80%. Отпад сеянцев дуба из-за отсутствия на корнях микоризы описан впервые Высоцким [4] для Мариупольского и Велико-Анадольского лесничеств (б. Екатеринославской губ.); то же явление впоследствии изучал Бараней [1] на разных лесных дачах и питомниках юга УССР.

Различия между микоризными и безмикоризными сеянцами начинают проявляться уже с первого года, но становятся особенно отчетливыми на втором году. Безмикоризные сеянцы-двухлетки сильно отстают в развитии, листья их буреют, вершинки отсыхают и в конце концов растения полностью погибают. Наряду с такими погибающими безмикоризными сеянцами наблюдаются группы дубков, совершенно здоровых, имеющих на корнях микоризу и развивающихся нормально. Нередко дубки, чахнувшие во втором году жизни и находящиеся вблизи нормальных микоризных дубков, могут на третьем году оправиться в результате заражения их корней микоризным грибом со здоровых сеянцев. Возможно, что при таком самовыздоравливании имеет значение не только механическое соприкосновение корней с микоризным грибом, но и состояние физиологической восприимчивости корней к заражению. По Юрре [10], часть сеянцев первого года жизни иммунна к заражению микоризным грибом. Описанное «самовыздоравливание» сеянцев не может, однако, иметь большое значение, так как скорость распространения в почве дубового микоризного гриба к концу второго года не превышает 30—50 см. В табл. 1 приведены показатели для безмикоризных и микоризных дубовых сеянцев-двухлеток по данным (на 23.VI) Баранея [1] для Березнеговатского питомника Николаевской области.

Таблица 1

Характеристика развития сеянцев	Микоризные	Безмикоризные
Длина надземной части (см) . .	35,5	17,5
Прирост за второй год (см) . . .	18,0	3,0
Вторичные побеги (см)	10,2	0,3
Вес надземной части (г)	17,0	3,1
Вес корней (г)	11,2	4,5
Число листьев	42	12
Общая поверхность листьев ($см^2$)	591	98

Положительное влияние микориз на развитие дуба в степи навело на мысль об искусственном заражении сеянцев дуба микоризным грибом. Наиболее простой способ такого заражения заключается во внесении в почву под дуб микоризной земли. Такой прием применялся различными исследователями [10] и подробно разработан Баранеем [2]. Микоризу заготавливают вместе с землей от корней хорошо развитых дубов. На черноземах и темнокаштановых почвах микоризную землю вносят весной при посеве желудей. По Бараней, микоризной земли требуется по объему вдвое меньше, чем желудей. Высоцкий [6] предлагал предварительно заражать желуди микоризой и для этой цели ссыпать их на зиму в бурты или ямы, подсыпая к ним земли из здорового дубового насаждения.

Микориза и сеянцы сосны

Микоризы на корнях сосны могут образовываться различными грибами (некоторые виды Boletus, Amanita, Cortinarius, Lactarius, Russula, Mycelium radicis silvestris, Mycelium radicis nigrostrigosum, Cenococcum

graniforme и др.). Благотворное влияние микоризы на развитие сосны и гибель сосновых сеянцев вследствие отсутствия микоризы впервые установлены Высоцким [4] по наблюдениям в Мариупольском и Велико-Анадольском лесничествах. Воззрения Высоцкого впоследствии были подтверждены исследователями в Англии и США. Hatch [13] заражал сеянцы Pinus echinata чистыми культурами микоризных грибов и получил следующие показатели для безмикоризных и микоризных растений (табл. 2). McComb [15] и McComb и Griffiths [16] установили, что в менее плодородных почвах, более бедных элементами минерального питания, резче проявляется благотворное действие микориз, чем в почвах, обильнее снабженных элементами питания.

Таблица 2

Характеристика развития сеянцев	Микоризные	Безмикоризные
Вес сухого вещества (г)	404,6	320,7
Отношение веса корней к побегам	0,78	1,10
Содержание азота (%)	1,24	0,85
» фосфора (%)	0,20	0,08
» калия (%)	0,74	0,43

Routien и Dawson [18] в опытах с Pinus echinata также наблюдали благоприятное действие микоризы только при пониженном почвенном плодородии. Ими установлена также бо́льшая интенсивность дыхания микоризных корней по сравнению с безмикоризными, причем выделение CO_2 микоризными корнями в анаэробных условиях не только понижалось, но даже усиливалось. В лабораторных опытах Young [21] два микоризных гриба Boletus granulatus и B. viscidus образовывали на целлюлозе столь значительные количества растворимых углеводов, что их оказалось достаточно для поддержания роста сеянцев Pinus taeda в песчаном субстрате, в атмосфере, лишенной углекислого газа. В отсутствие же микоризных грибов сеянцы эти в указанных условиях, разумеется, не развивались. Опыты Юнга пока являются единственным указанием на то, что роль микориз может заключаться не только в стимулировании азотно-минерального питания сеянцев, но и углеродного. Разумеется, такие данные нуждаются в проверке и подтверждении. Принципиальное значение всех изложенных опытов заключается в окончательном установлении благотворного влияния микоризного симбиоза на развитие сеянцев сосны. Rayner и Neilson Jones [17] нашли, что главная причина неудачного разведения сосны на верещатниковых почвах вблизи Wareham (Англия) заключалась в отсутствии в этих почвах необходимого для сеянцев сосны микоризного гриба (Boletus bovinus). По мнению этих авторов, в этих верещатниковых почвах содержится токсическое для микоризных грибов вещество (предположительно H_2S), которое обусловливает непригодность этих почв для сеянцев сосны. Новые исследования тех же почв, произведенные Brian и сотрудниками [11], установили однако, что токсичность верещатниковых почв для микоризных грибов обусловлена накоплением в них глиотоксина и других антибиотиков, продуцируемых обильно представленными в этих почвах пенициллами. Идеи Высоцкого о необходимости микоризы для нормального развития сосны в безлесных степных районах были подтверждены также White [20], который исследовал причины гибели сеянцев сосны на безлесных почвах южных районов Висконсина (США) на границе леса и прерий. Сеянцы Pinus resinosa и Pinus strobus крайне плохо развивались на степной почве, но достаточно

было примешать к последней некоторое количество почвы из лесных районов, чтобы вызвать нормальное их развитие. Такой же эффект получался при заражении степной почвы культурой микоризного гриба, полученной с корней сосны из районов ее нормального произрастания.

В практике степного лесоразведения известны случаи, когда сосновые семена, привозимые в новый отдаленный от сосновых насаждений питомник, оказывались в отношении микоризы стерильными. Такое положение наблюдал Высоцкий в 1922 г. на Сейтлерском питомнике (Крым), где на большой площади сеянцы крымской сосны (Pinus Pallasiana) по второму году вследствие отсутствия на корнях микоризы были мелки, бурели и засыхали.

Практические мероприятия для устранения безмикоризного развития сеянцев сосны в общем такие же, как в случае с дубом. Безмикоризные сеянцы-однолетки нельзя высаживать на полосу, ибо в этом случае им угрожает массовая гибель. Как указывает Высоцкий, надо оставить их на второй год в питомнике, тогда произойдет дифференциация здоровых микоризных сеянцев от больных стерильных, и главное — часть сеянцев, в однолетнем возрасте стерильных, успеет заразиться от здоровых микоризным грибом и оправиться.

Микоризы и другие древесные породы

Не все древесные породы ведут себя как дуб и сосна. Ильмовые, ясеневые, кленовые у нас в степях на новой почве нового питомника, при ее хорошей подготовке, страдания от отсутствия микоризы не проявляют. Неясное положение занимают в этом отношении липа, береза, бук. Они на степных почвах местами хорошо произрастают, а в питомниках удаются плохо (Высоцкий).

Выводы

1. Помимо почвенно-климатических факторов, имеющих значение при разведении лесных пород на степных безлесных почвах, могут иметь значение факторы биотические, в частности, отсутствие в степных почвах необходимых для корней ряда древесных пород грибных симбионтов.

2. К числу древесных пород, у которых возможны страдания и массовая гибель в питомниках на степных, извечно безлесных почвах, относятся прежде всего дуб и сосна. Недостаточно ясное положение занимают береза, липа, бук.

3. Одни и те же виды древесных пород могут в разных условиях иметь в составе микоризы различные виды грибов. Необходимо микробиологическое изучение видового состава и физиологических особенностей микоризных грибов основных древесных пород для различных почвенно-климатических районов СССР.

4. Необходима разработка эффективного метода искусственного размножения микориз наподобие производства бактериальных удобрений для массового их использования в деле степного лесоразведения.

Получено 3.IV.1949

Институт почвоведения
Академии Наук Каз.ССР
Алма-Ата

ЛИТЕРАТУРА *

1. Бараней А. В. Влияние микоризы на рост и состояние дуба. Лесное хозяйство, 6, 31, 1939.
2. Бараней А. В. Опыты внесения микоризных грибов в почву. Лесное хозяйство, 10, 45, 1940.

* В настоящем списке приводится только наиболее важная иностранная литература, появившаяся в последние годы.

3. Вильямс В. Р. Почвоведение, 4-е изд., Москва, 1940.
4. Высоцкий Г. Н. Микорица дубовых и сосновых сеянцев. Лесопромышленный вестник, 9, 1902.
5. Высоцкий Г. Н. К вопросу о причинах усыхания лесных насаждений на степном черноземе. Тр. по лесному опытному делу в России, вып. 40, 18, 1912.
6. Высоцкий Г. Н. Напоминание степным лесоводам о микоризе. Лесное хозяйство, вып. 10—11, 1929.
7. Ганешин С. С. О связи микоризы сосны и лиственницы с гименомицетами Boletus scaber и Boletus elegans. Болезни растений, 4, 105, 1923.
8. Каменский Ф. Die Vegetationsorgane des Monotropa Hypopitys, Bot. Z., 29, 1881.
9. Труды по лесному опытному делу в России. Вып. XV, СПб., 31, 1909.
10. Юрре Н. А. Письмо в редакцию. Лесное хозяйство, 12, 71, 1939.
11. Brian P., Hemming H. and McGowan J., Origin of a toxity to mycorrhiza in Wareham Heath soil. Nature, 155, 637, 1945.
12. Harley J. L. Mycorrhiza and soil ecology. Biol. Rev., 23, (2), 127, 1948.
13. Hatch A. B. The role of mycorrhizas in afforestation. J. For., 34, 22, 1936.
14. Magrou J. Des orchidées à la pomme de terre. Paris, 1943.
15. McComb A. L. The relation between mycorrhizae and the development and nutrient absorption of pine seedlings in a prairie nursery. J. For., 11, 48, 1948.
16. McComb A. L. and Griffiths J. S. Growth stimulation and phosphorus absorption of mycorrhizal and non-mycorrhizal white pine and Douglas fir seedlings in relation to fertiliser treatment. Plant Physiol., 21, 11, 1946.
17 Rayner M. C. and Neilson Jones W. Problems in tree nutrition. London, 1944.
18. Routien J. and Dawson R. Some interrelationships of growth and salt absorption, respiration and mycorrhizal development in Pinus echinata (Mill.). Amer. J. Bot., 30, 440, 1940.
19. Schmidt E. L. Mycorrhizae and their relation to forrest soils. Soil Sci., 64, 459, 1947.
20. White D. P. Prairie soil as a medium for tree growth. Ecology, 22, 398, 1941.
21. Young H. Carbohydrate absorption by roots of Pinus taeda. Biol. Abstr., 22 (5), 1043, 1948.

ГРИБНЫЕ БОЛЕЗНИ СЕЯНЦЕВ И САЖЕНЦЕВ

(Обзор)

И. Г. Бейлин

Введение

Согласно постановлению Совета Министров и Центрального Комитета ВКП(б) от 20 октября 1948 г., план выращивания посадочного материала для создания полезащитных лесонасаждений выражается по годам в таких цифрах: в 1949 г. необходимо вырастить 2 866 млн., в 1950 г.— 4 161 млн., в 1951—1955 гг.— 26 685 млн. сеянцев.

Вырастить такое количество здорового посадочного материала — задача почетная, но и ответственная. Чтобы обеспечить выполнение этого грандиозного плана и с каждым годом совершенствовать процесс выращивания, а также избежать в ближайшем будущем неудач, надо изучить тот относительно небольшой опыт по выращиванию сеянцев, который накопился за предыдущие годы. Этот опыт показал, что высевали в питомниках много семян, всходило их меньше, а сеянцев выращивалось часто недопустимо мало. Слишком часто сеянцы в питомниках гибли от массовых заболеваний и повреждений, вызывавшихся самыми разнообразными причинами: неблагоприятными почвенными условиями, погодой, избытком освещения, неправильным выбором срока посева, поражениями вредителями и болезнями. Возбудителями последних чаще бывали грибы.

Задача данной статьи — охарактеризовать состояние вопроса о грибных заболеваниях сеянцев и саженцев, в беглом обзоре литературных данных выявить имеющиеся в этой области достижения и указать неотложные мероприятия, ставящие целью резкое снижение вредоносности грибных заболеваний в питомниках в ближайшие же годы. При выполнении поставленной нами задачи мы исходили из двух основных положений.

1. Всякий болезненный процесс у растений, как и у животных, развивающийся под влиянием инфекции, есть результат взаимовлияния микро- и макроорганизма, исход которого определяется агрессивностью первого, устойчивостью к инфекции второго и влиянием окружающей среды на того и другого. И отсюда вывод: при изучении грибных как и других инфекционных заболеваний, мы должны выявлять агрессивность гриба, степень устойчивости данной породы, формы к поражению этим грибом и влияние почвы, погоды, степени освещения и ряда других факторов на паразита и хозяина.

2. Всякая эпифития, как и эпидемия, эпизоотия — не случайное явление. Она — высший пункт в серии явлений, постепенно развивавшихся,— следствие фактов, постепенно незаметно накапливавшихся. И отсюда вывод: чтобы предупреждать эпифитии, надо изучить динамику распространения паразита, реакцию хозяина на паразита и условия, благоприятствовавшие возникновению и распространению эпифитий или затуханию их.

Учитывая, что до последнего времени основным объектом изучения в питомниках были болезни сеянцев сосны, что ни одной другой куль-

туре в питомниках не уделено было столько внимания, естественно начать с обзора литературных данных по болезням сеянцев сосны.

Грибные заболевания сеянцев и саженцев хвойных

Выпревание сеянцев сосны

По наблюдениям Гуляева (1948), выпревание сеянцев сосны в лесных питомниках наблюдается ранней весной, тотчас после схода снега, только на однолетних сеянцах. Вызывается оно грибом Sclerotinia graminearum Elen. и Typhula graminearum Gul. sp. nov.

Выпревание сеянцев впервые было обнаружено Трошаниным в 1936 г. в одном из питомников Казанского лесхоза Татреспублики, где оно охватило 80% сеянцев. В 1947 г. это заболевание было обнаружено в некоторых питомниках Раифского лесхоза Татреспублики на 30% сеянцев. Только поздней осенью 1947 г. удалось прорастить склероции, имевшиеся на больных растениях, и установить, что возбудителем этого заболевания является Sclerotinia graminearum Elen., поражающая многолетние дикорастущие злаки и озимые посевы хлебов.

Проявляется заболевание в пожелтении верхушки сеянца. Позже на почке, на стволике вблизи почки, иногда внутри стволика можно найти вначале беловатые, потом чернеющие склероции размером от 1 до 6 мм. Пораженные сеянцы или усыхают, или в результате появления побегов из спящих почек становятся многовершинными, отстают в росте.

Typhula graminearum обычно поражает однолетние, реже двухлетние сеянцы, вызывая потерю тургора в хвое, побурение и усыхание хвои и образование на ней, на стволике, в пазухах хвои светложелтых, позднее чернеющих склероциев размером до 2 мм.

По сообщению Трусовой, выпревание сеянцев сосны в результате поражения грибом, неправильно отнесенным ею к роду Calonectria sp., в питомниках Московской области в 1938 г. вызвало отпад сеянцев до 50% и больше. Выпревание в этот год отмечено и в других областях. Избыточная влажность почвы благоприятствовала массовому выпреванию.

Сбор и сжигание заболевших сеянцев и сорняков как источников инфекции, глубокая пахота с предплужником, при которой поверхностный слой почвы со склероциями на нем попадают на такую глубину, где они не могут прорастать, отвод воды из понижений, где она задерживается,— способствуют созданию условий, неблагоприятных для развития возбудителя этого заболевания.

Полегание сеянцев

Возбудители этого заболевания выделены из сеянцев сосны, лиственницы, пихты, ели, кедра. Проявляется это заболевание в том, что у молодых сеянцев в возрасте приблизительно до трех месяцев стволик у основания начинает темнеть и утончаться, в результате чего сеянцы полегают. Такие растения легко выдергиваются из почвы, так как корни их гнилые. Вызывается заболевание грибами из родов: Fusarium, Altennaria, Verticillium, видами: Botrytis cinerea, Pythium de-Baryanum, Moniliopsis Aderholdii.

Детальное описание симптомов заболевания, большой экспериментальный материал по выявлению возбудителей его, хорошо разработанную систему мероприятий лесохозяйственных и по применению химического метода дала Карпова-Бенуа в своей работе, к сожалению ставшей библиографической редкостью.

По Соколову, наиболее опасными для сеянцев являются: Fusarium herbarum Fr., F. herbarum var. avenacearum Wr., F. bulbigenum Cke et

Mass. var. blasticola Wr., F. solani App. et Wr., F. sporotrichoides Sherl., F. moniliforme Cheld. О вредоносности этого заболевания говорят сообщения Дунина, Нестерчука и других.

По сведениям, полученным Гуляевым (1948) в Татреспублике, наибольшее распространение болезнь имела в 1937, 1939 и 1940 гг. Процент пораженных сеянцев в 1939 г. равнялся 34 в семи лесхозах, в 1940 г.— 41 в четырех лесхозах.

Обычно указывается, что условиями, благоприятствующими полеганию, являются низкая температура, избыточная влажность, сильная инсоляция. Выводы эти носят чисто умозрительный характер, так как строятся они на основании случайных наблюдений, часто на совершенно несравнимых данных. Обзор всех опубликованных работ по этим заболеваниям показывает, что нет длительных опытов, поставленных по разработанной программе, подобных тем, которые в течение десятилетий проводятся в полеводстве при изучении влияния температуры, влажности почвы и воздуха, сроков сева на развитие массовых заболеваний.

Решающим мероприятием по предупреждению массового полегания сеянцев является протравливание семян раствором формалина в концентрации 0,15% и дезинфекция почвы крепкой серной кислотой, растворенной в 6—12 л воды, в зависимости от влажности почвы: чем суше почва, тем больше воды. Для дезинфекции почвы на 1 м^2 расходуется 40 см^3 кислоты. Детальные указания по протравливанию семян и почвы даны в работе Журавлева.

Подсушивание и сжигание заболевших сеянцев являются хорошим санитарным мероприятием в борьбе с болезнями полегания. Ниже на табл. 1 из работы Карповой-Бенуа показано влияние качества семян на число сеянцев, сохранившихся к концу сезона.

Таблица 1

Влияние качества семян на увеличение заболевания

Качество семян	Проросших в %	Погибших в %	Сохранившихся к концу сезона в %
Сосна Псковского ЛПХ сбора 1932 г. Всхожесть 96%, энергия 95°	61,3	3,2	54
Сосна Ивано-Вознесенского сбора 1930 г. Всхожесть 82%, энергия 80°	18,8	5,8	15

Искривление и отмирание ветвей сосны

При этом заболевании на верхних частях стволиков или побегов появляются продолговатые оранжевые подушечки в 2 см длины и 2—3 мм высоты, выступающие из-под лопнувшего эпидермиса. В результате поражения верхушка стволика искривляется или отмирает. Чаще наблюдается первый случай и отсюда название заболевания — сосновый вертун. Пораженные сеянцы, как правило, становятся многовершинными. Так как грибница возбудителя заболевания распространяется в коре пораженных побегов, где и перезимовывает, болезненное состояние сохраняется в течение ряда лет. Вызывается это заболевание грибом Melampsora pinitorqua, эцидиальная стадия которого развивается на сосне, а летняя и осенняя — на осине и белом тополе. По наблюдениям Трошанина, болезнью поражаются преимущественно сосновые молодняки. При обследовании Трошаниным болезней сеянцев в 1932 г. в 28 лесных питомниках Татреспублики — сосновый вертун обнаружен им в 10 питомниках, из них в некоторых пораженных сеянцев было 70—90%.

По его же данным, в 1936 г. в питомнике Столбищенской дачи Приволжского лесхоза было поражено вертуном 66% сеянцев, в 1937 г. в питомнике Лаишевского лесхоза — 62%. Поскольку мицелий этого гриба перезимовывает в коре, заболевание это носит характер хронического, обусловливает значительное снижение прироста пораженных деревьев в высоту и многовершинность.

В Изюмском лесничестве в 1937 г. (Украина) отмечено сильное повреждение этим грибом однолетних сеянцев. В связи с засухой заболевание обусловило гибель сеянцев в питомниках от 30 до 78%. По данным Главного управления лесоохраны и лесонасаждений (Трошанин) на 1 января 1938 г., сосновый вертун обнаружен в лесах управлений: Московского Горьковского, Татреспублики, Средне-Волжского, Нижне-Волжского, Верхне-Донского и Калининского.

По данным Трусовой (1938), отпад сеянцев под влиянием этого заболевания доходил до 80% в Н.-Оскольском лесхозе Курской области, до 70% в Дзержинском лесхозе Смоленской области. Район распространения отмечен в 23 областях, причем 70% областей составляют центральные и северные зоны, а 30% — южные. Охвачены были поражением преимущественно двухлетки, реже однолетки.

В опытах Трошанина в 1945 г. в Раифском лесничестве Казанского лесхоза Татреспублики внесение осиновых листьев на борозды с посевом сосны дало 70% заражения сеянцев.

Поскольку на сосну гриб переходит с листьев осины, решающим мероприятием по предупреждению этого заболевания является закладка сосновых питомников вдали от осиновых насаждений, сбор и сжигание листьев под отдельно стоящими осинами, расположенными вблизи питомника.

Нередко отмирание ветвей у различных видов сосен вызывается другим заболеванием, которое проявляется в покраснении основания хвои, последующем отмирании и опадении ее, а затем и засыхании ветвей. Возбудителем этого заболевания является гриб Cenangium abietis, споры которого проникают через ранения, а грибница, развившаяся из них, распространяется в коре, откуда проникает в основания хвои. Из коры же грибница проникает по сердцевинным лучам в древесину, вызывая отмирание ветвей. На таких ветвях образуются конидиальные плодоношения этого гриба, известные под названием Dothichiza ferruginosa, пикниды которого имеют вид мелких черных выпуклых подушечек, расположенных рядами, вдоль побега. Подробное описание этого гриба дано Дудиной, которая сообщила о массовом распространении этого гриба, наблюдавшемся в 1938 г. в северном Казахстане, где им было охвачено, по неполным подсчетам, не менее 10 тыс. га и где отмирали не только отдельные ветви, но и целые деревья, особенно молодые. По сообщению Трусовой, конидиальная стадия этого гриба обнаружена в 1938 г. в массе на двухлетках в питомнике Буландинского лесхоза Казахской ССР. Дудина сообщает, что эпифития эта возникла после двух засушливых лет, сильно ослабивших деревья. Очаги этой эпифитии, динамика ее распространения во времени и пространстве, как и многих других заболеваний, остаются невыясненными, рациональные мероприятия по предупреждению этого заболевания остаются неизученными.

Пожелтение и отмирание хвои

Первые симптомы этого заболевания появляются осенью и характеризуются покраснением хвои. Весной на такой хвое появляются пикниды гриба в виде черных точек. К осени хвоя опадает и на ней появляются апотеции гриба. Созревшие споры в апотециях заражают хвою весной. Вызывается это заболевание грибом Lophodermium pinastri и в лесоводстве носит название шютте. На основании анализов большого

числа образцов сеянцев, полученных Всесоюзным научно-исследовательским институтом лесного хозяйства в 1938 г. из 15 областей, Трусова пришла к заключению, что в областях Центральной полосы шютте имеет значительно большее распространение, чем в южных. L. pinastri встречается на сеянцах различных видов сосен (Pinus silvestris, P. montana, P. nigra, P. cembra). Наиболее восприимчивой к нему является обыкновенная сосна P. silvestris.

Вредоносность этого заболевания так характеризовал Турский еще в 1893 г.: «Слишком чувствительна в хозяйстве эта болезнь. Довольно указать лишь на факт, что во многих питомниках под Москвой старательно ежегодно сеют более или менее значительное количество сосновых сеянцев и, не взирая на это, ни один питомник не может отпустить несколько сотен сосны 2—3-летнего возраста. Сосна только до 1-летнего возраста остается здоровой; если же она осталась на семенной гряде на второй год, то гибнет».

По наблюдениям Гуляева (1948), шютте — одно из наиболее опасных заболеваний сеянцев сосны в Татреспублике. Сильное распространение его отмечено им в 1941 г. «За последние годы,— писал он в 1948 г.— экономическое значение шютте вновь возросло. В 1945—1948 гг. болезнь наблюдалась в питомниках целого ряда областей и республик и причинила значительный ущерб».

О сильном распространении шютте в Собических борах Черниговской области писал Самофал. L. pinastri поражает хвою молодых деревьев, а иногда и старых. Особенно это заболевание опасно для сеянцев, у которых часто теряется вся зеленая хвоя. Поскольку источником инфекции является отмершая хвоя с апотециями на ней, сосновые питомники нельзя закладывать вблизи сосновых насаждений и отдельно стоящих сосен. Опавшая хвоя с больных сеянцев в самом питомнике должна своевременно собираться и сжигаться. В целях предупреждения заражения шютте сеянцы должны опрыскиваться бордосской жидкостью. В опытах Горшина наиболее эффективными фунгисидами оказались препарат аремаля и купфермеритоля.

В статье Гуляева (1948) «Как предохранить питомники сосны от шютте» дана комплексная система мероприятий по предупреждению этого заболевания.

Поскольку очень часто спрос на хороший посадочный материал не покрывался предложением его, вставал вопрос об использовании в посадках сеянцев, пораженных шютте. Трошаниным и Гуляевым были проведены опытные посадки таких сеянцев, которые показали, по их мнению, что часть таких сеянцев все же может быть использована. Мы полагаем, что итти по этому пути — это значит идти по линии наименьшего сопротивления. Надо все-таки предпочесть другой путь — выращивать здоровый материал. Еще в 1925 г. Самофал писал: «Культивирование хорошо развитыми сеянцами дает большую уживчивость культуры при ее заболеваниях, например, от грибка Lophodermium pinastri. В одном из опытов на пятом году жизни культур, когда последние особенно страдали от шютте, процент здоровых растений у культур от хорошо развитых сеянцев на 58% выше, чем у культур от плохих сеянцев». Выращивание здорового материала — лучший метод в борьбе с шютте, хотя и более трудный.

Отмирание хвои, вызываемое грибом Phacidium infestans,— результат заболевания, которое развивается ранней весной, еще под снегом. Больные сеянцы кажутся опутанными бесцветным паутинообразным мицелием. Вначале хвоя больных сеянцев окрашена в желтовато-коричневый цвет, позднее переходящий в светлосерый. Еще весной на отмершей хвое видны мельчайшие пятна, на которых позже развиваются апотеции возбудителя болезни. Болезнь поражает сеянцы и саженцы. По наблюдениям Гуляева, в отдельных питомниках процент пораженных

сеянцев доходил до 10, но за последние годы заболевание это начало встречаться чаще. Трусова получала образцы, пораженные этой болезнью, из питомников Московской области. Болезнь эта недостаточно еще изучена. Мероприятия по предупреждению — те же, что и для шютте.

Первое сообщение о поражении сосенок грибом Sclerophoma pithyophila сделано Назаровой, которая наблюдала его весной 1924 г. под Москвой. Болезнь проявлялась в усыхании вершинок и в образовании кисточек и небольших метел на концах побегов. Мицелий гриба найден в коре, древесине и сердцевине больных сосен. Заболевание обнаружено как на молодых (10—12-летних), так и на старых (60—70-летних) деревьях. Назаровой изучена морфология и биология гриба и анатомия пораженной сосны, поставлены опыты по искусственному заражению, давшие положительные результаты. По сообщению Гуляева (1948), в 1939 г. усыхание сеянцев сосны под влиянием этого гриба носило массовый характер в Чебоксарском лесхозе Чувашской АССР. Надо думать, что Sclerophoma pithyophila и Dothichiza — синонимы конидиальной формы Cenangium abietis.

Для определения важнейших заболеваний сосновых сеянцев можно пользоваться таблицами, составленными Гуляевым (1940).

Грибные заболевания сеянцев и саженцев лиственных пород

О выпревании сеянцев лиственных пород нет литературных данных. Естественно допустить, что в тех почвенно-климатических зонах, где возбудители этого заболевания развиваются на диких и культурных растениях, они могут быть опасными и для сеянцев лиственных.

Полегание последних может вызываться теми же грибами, что и сеянцев хвойных. По сообщению Черкашиной, при обследовании за последние годы агро-лесомелиоративных питомников на Украине было выявлено, что наиболее опасной болезнью было полегание сеянцев белой и желтой акации, ясеня обыкновенного, лоха и др. Микологический анализ показал, что, например, почвы Владимирского питомника (Николаевской обл.) сильно заражены грибами рода Fusarium. К сожалению, остается неизвестным, как вели себя в этих условиях сеянцы дуба. О неблагополучии с последними говорит сообщение Баранея (1939). По его наблюдениям в Винницкой области в 1936, 1937, 1939 гг. отмечалось массовое загнивание корней дубовых сеянцев и саженцев, из которых им был выделен ряд грибов из родов: Penicillium, Fusarium, Verticillium, Coremia и других.

Поскольку обычно пораженной оказывалась сердцевина коры, он полагал, что возбудители этого заболевания проникали через подрезанные корни, при повреждениях насекомыми, в частности личинками хруща. В отдельных лесничествах процент пораженных растений доходил до 50—65. Загнивание наблюдалось как на двухлетних сеянцах, так и на шестилетних дубках. Исследование показало, что процесс загнивания сердцевины может локализоваться и прекращаться, если корни не подвергались последующим поранениям и условия для нормального роста и развития их благоприятны. Если корневая система сильно ослаблена, саженцы дуба засыхали. Неясным остается, как вели себя другие породы в тех местах, где наблюдалось загнивание корней дуба. В целях предупреждения этого заболевания Бараней рекомендовал посадку растений с хорошо развитой корневой системой и уничтожение личинок хруща.

В очень редких случаях у нас встречено заболевание сеянцев дуба и молодых дубков, при котором листья, начиная сверху вниз, засыхают. При выдергивании корня такого растения на нем наряду с обычной грибницей наблюдаются беловатые, позже коричневатые. тонкие шнуры

и черные шаровидные склероции величиной с булавочную головку. Такое загнивание корня, естественно, вызывает гибель заболевших растений.

Возбудителем этого заболевания является гриб Rosellinia quercina Hart. За рубежом оно встречается часто, у нас это заболевание — карантинный объект.

Мучнистая роса дуба

Наиболее опасным заболеванием для сеянцев дуба надо считать мучнистую росу дуба. Внешне это заболевание проявляется в появлении на верхней или нижней, часто на обеих сторонах листьев мучнистого налета, состоящего из грибницы и конидий гриба. Такой налет, появляясь вначале отдельными пятнами, постепенно покрывает весь лист, буреет, а к осени на нем появляются мельчайшие клейстокарпии, а в них сумкоспоры. Часто мучнистая роса поражает и молодые побеги. Сильное поражение мучнистой росой нарушает нормальные процессы ассимиляции, дыхания, вызывает свертывание и преждевременное засыхание листьев. Пораженные побеги обычно не достигают зимней спелости и часто побиваются осенними заморозками.

Болезненный процесс, вызываемый мучнистой росой, факторы, способствующие интенсивности его развития и снижающие вредоносность росы, хорошо изучены Власовым, и проект составленного им наставления по борьбе с мучнистой росой — хороший образец того, как надо строить систему мероприятий по предупреждению массового заболевания и борьбе с ним, исходя из знания биологии и экологии растения-хозяина и паразита.

В этом наставлении, к сожалению еще неопубликованном, намечены как лесокультурные и лесохозяйственные мероприятия, так и химические мероприятия по борьбе с мучнистой росой и дано детальное описание фунгисидов, доз их, аппаратуры, сроков и техники опрыскиваний и опыливаний.

По данным Власова, первичное заражение листьев сумкоспорами из перезимовавших клейстокарпиев происходит при наступлении погоды с устойчивыми среднесуточными температурами не ниже 16—17°. Это говорит о том, что условия Юга и Юго-Востока РСФСР могут являться особо благоприятными для возникновения эпифитий, вызываемых этим грибом, что мероприятиям по предупреждению его должно быть уделено особое внимание.

Голландская болезнь ильмовых

Эта болезнь поражает вяз, берест, ильм. Внешне она проявляется в засыхании, скручивании листьев, отмирании сначала молодых, а позже и старых ветвей.

Характерный симптом этого заболевания — засохшие листья — сохраняют свою зеленую окраску. На поперечном разрезе отмершей ветви наблюдается резкое сплошное темнокоричневое кольцо в наружных годичных слоях.

Болезнь эта, вызываемая грибом Graphium ulmi Schw., протекает часто в такой острой форме, что пораженные деревья засыхают в течение одного лета. О размерах ее в пределах РСФСР можно судить по работе Дудиной (1938), статье Захарова, Потапова и Вилкова, насыщенной большим материалом, статье Щербин-Парфененко.

По наблюдениям последнего, берест, вяз, ильм поражаются голландской болезнью и в самом молодом возрасте. Учитывая наличие этого заболевания в степи, в лесостепи и инфекционность его, надо всячески заботиться о предупреждении появления ее в питомниках и молодых посадках путем уничтожения очагов инфекции.

Очень важно следующее обстоятельство: в результате своих опытов по искусственному заражению этим грибом трех видов карагача Соловьева (Среднеазиатский научно-исследовательский институт лесного хозяйства пришла к выводу, что среди испытанных видов карагачей Ulmus pumila является высокоустойчивым к голландской болезни.

Листья сеянцев и саженцев ивы, тополя, березы, осины поражаются отдельными видами ржавчины, на сеянцах. и саженцах других пород встречаются пятнистости, вызываемые грибами из родов Gloeosporium, Phleospora, Phyllosticta, но, как правило, хозяйственное значение их не велико сравнительно с вредоносностью перечисленных выше грибов.

Неодинаковая агрессивность паразитов и разная восприимчивость хозяев к паразитам

В нашей отечественной лесной фитопатологии вопросу о неодинаковой агрессивности отдельных рас или штаммов грибов, поражающих сеянцы и саженцы, не уделено должного внимания. А между тем имеются наблюдения и опыты, показывающие резко отличную агрессивность

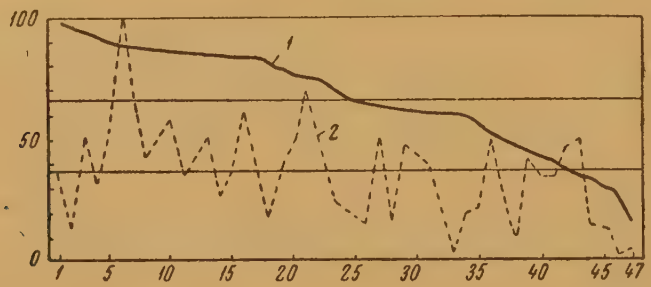


Рис. 1. *1* — средняя вирулентность для Pinus banksiana; *2* — средняя вирулентность для Pinus resinosa

отдельных штаммов в отношении одного и того же вида деревьев и одного и того же штамма к разным видам одной и той же породы. На рисунке представлены результаты опыта Hartley с искусственным заражением двух видов сосен 47 штаммами Pythium de-Baryanum, полученными из разных областей США. Числа по абсциссе обозначают номера штаммов, числа по ординате — процент погибших растений. Сплошная кривая показывает отношение разных штаммов к Pinus banksiana, прерывистая — отношение к P. resinosa. Из рисунка видно, что, например, штамм № 46 вызвал гибель 3% P. resinosa, штамм № 3 — 54%, штамм № 7 — 100%, что говорит о резко отличной агрессивности этих штаммов. Этот же рисунок показывает, как резко отлично ведут себя оба вида сосны в отношении отдельных штаммов гриба.

Другой пример: Phacidium infestans в Западной Европе найден только на шотландской сосне, в Северной Америке эта порода не поражается им, и естественно полагать, что в данном случае речь идет о двух расах неодинаковой агрессивности. Таких примеров немало.

Как неодинаково ведет себя одна и та же порода в отношении одного и того же гриба, в зависимости от происхождения семян этой породы, показывает такой пример: Haack посадил у себя в питомнике в Эбервальде однолетки сосны из семян различного происхождения и искусственно заразил их спорами Lophodermium pinastri.

Из табл. 2 видно, что сеянцы из семян Рейнпфальца, Бельгии, Оверни почти нацело погибли через два года, сеянцы из семян Пермской губ. погибли в количестве только 25%.

Таблица 2

Влияние искусственного заражения шютте сосен различного происхождения

Происхождение семян	Число посаженных однолеток весной 1908 г.		На 7/VII 1909 г. осталось в живых в %			На 26/VII 1910 г. осталось в живых в %		
	делянка 1	делянка 2	делянка 1	делянка 2	всего	делянка 1	делянка 2	всего
Пермская губ. . . .	30	32	100	100	100	77	73	75
Курляндия	100	170	89	90	90	73	60	65
Рейнпфальц	36	170	86	89	88	19	11	13
Бельгия	90	150	86	73	78	18	13	15
Оверни	108	180	89	88	88	20	9	14

И в опытах Гуляева с посевом семян из ряда областей, отличных по своим почвенно-климатическим условиям, несколько бо́льшую устойчивость к шютте показали сеянцы из семян, собранных в Кировской области. Но «и они в условиях массовой инфекции погибли»,— пишет Гуляев. Получается впечатление, что продолжать работу в этом направлении не стоит. Такой скептицизм ничем не оправдан. Важен факт установления неодинаковой устойчивости к этому заболеванию. Если бы семена в разных точках собирались с наиболее хорошо развитых растений, если бы индивидуальный отбор наиболее устойчивых индивидуумов длился не один только год, возможно, что были бы выявлены расы сосны, устойчивые к Lophodermium pinastri. Нет сортов овса (Avena sativa) и сортов пшеницы (Triticum durum), абсолютно устойчивых к видам головни или ржавчины, но есть сорта, слабо поражаемые, и они с успехом высеваются на миллионах гектаров и дают высокие урожаи и в годы эпифитий. Этот большой опыт по селекции на устойчивость, накопленный в полеводстве, надо использовать в деле выявления форм, рас сосны, устойчивых к шютте и ряду других заболеваний сеянцев.

Число таких примеров можно было бы умножить. Они говорят о том, что вопросы эти имеют не только теоретическое, но и практическое значение и должны быть включены в планы научно-исследовательских работ на ближайшие годы. Признавая большую эффективность химического метода в защите питомников от массовых заболеваний, нельзя забывать о его дороговизне и трудоемкости в наше время, когда под питомники отводятся тысячи гектаров, и потому надо выявлять другие методы предупреждения массовых заболеваний, более дешевые и менее трудоемкие.

Комплекс мероприятий по предупреждению массовых заболеваний и по борьбе с ними

Всякая болезнь — это процесс, нарушающий нормальные отправления растений, протекающий во времени и пространстве; острота и длительность его неодинаково протекают в различное время года, в разные стадии развития больного растения, в различных почвенно-климатических зонах при определенных условиях погоды. Методы предупреждения массовых заболеваний в основном сводятся к тому, чтобы создать обстановку наиболее благоприятную для культивируемого растения и наименее благоприятную для возбудителя заболевания. Обстановка — это почва, макро- и микрорельеф, макро- и микроклимат, водный и температурный режим, кислотность и щелочность почвы. Поставить все это на службу культурному растению и во вред паразиту можно только продуманной системой мероприятий, настойчиво и упорно проводимой в жизнь. Создать такую систему, разработать комплекс приемов, объединенных в стройное целое, указать, в какой последовательности во вре-

мени этот комплекс должен проводиться,— главная задача фитопатологии вообще, лесной — в частности.

Роль уровня агротехники

Попробуем на нескольких примерах показать, какую роль играет агротехника в деле предупреждения массовых заболеваний сеянцев. Sclerotinia graminearum, вызывающая выпревание сеянцев сосны весной, чаще наблюдается на почвах с большой кислотностью, наибольшее поражение сеянцев наблюдается в пониженных местах, там, где застаиваются дождевые и талые воды. Встречается этот гриб и на диких злаках. Склероции его на поверхности почвы прорастают ранней весной. Чтобы предупредить это заболевание, рекомендуется тщательно выравнивать посевную площадь в питомнике, уничтожать сорняки — передатчики склероции, зяблевую вспашку производить на большую глубину, с предплужником, чтобы похоронить склероции на такую глубину, где они не прорастают.

На основании своих опытов и наблюдений Гуляев пришел к заключению, что выпревание сеянцев сосны наблюдается чаще при избытке влажности в поверхностном горизонте почвы, при глубокой заделке семян, и потому рекомендует в качестве предупредительных мер в борьбе с полеганием сеянцев производить посевы сосны только на песчаных почвах, а при глинистых почвах улучшать их прибавлением в гряды песка, избегать глубокой заделки сеянцев.

Тургорная теория, говорящая о том, что заражение сосны шютте способствует понижению тургора в клетках, считается сейчас общепризнанной. По этой теории все факторы, нарушающие нормальный водный баланс сеянца или саженца, понижающие тургор в клетках, создают обстановку благоприятную для интенсивного развития Lophodermium pinastri. А факторами этими являются мелкая обработка почвы, неправильная посадка, сорняки,— то, что характеризует низкий уровень агротехники. Только на основе высокой агротехники могут и должны строиться дополнительные, специальные мероприятия по предупреждению массовых заболеваний.

Вопросы высокой агротехники в питомниках достаточно хорошо разработаны, агротехнику эту надо внедрять в производство.

Химический метод

Можно во-время на должную глубину вспахать участок под питомник, содержать его чистым от сорняков, но засеять семенами, не освобожденными от инфекции на них или в них, — и инфекционные болезни появятся в питомнике. Можно протравить семена и посеять их в землю, зараженную вредоносными грибами,— и болезни в условиях, благоприятных для прорастания их возбудителей, появятся. И отсюда вывод: сеять надо только здоровыми или обеззараженными семенами в почву, свободную от инфекции или продезинфицированную, если она заражена. В данное время вопросы о наиболее эффективных фунгисидах для протравливания семян, о концентрации фунгисидов и экспозиции семян в минутах, о долях фунгисидов для дезинфекции почвы — относительно хорошо разработаны в отечественной литературе. Достаточно указать на работу Журавлева и Соколова «Грибные болезни семян древесных и кустарниковых пород», которая может считаться хорошим руководством по фитопатологическому анализу семян, для выбора протравителей семян и почвы, применительно к тому или другому заболеванию ряда пород. Виды Fusarium особенно устойчивы к фунгисидам. В тех случаях, когда всходы заражены грибами этого рода, Журавлев рекомендует протравливать грядки со всходами раствором марганцево-

кислого калия — 40—50 г на 1 м² в растворе на 6—12 л воды, в зависимости от сухости почвы.

Немало полезного материала имеется на эту тему и в работе Ванина (1948). В ней описаны современные приборы для опрыскивания и опыливания надземных частей сеянцев и саженцев в борьбе с такими болезнями, как шютте, пятнистости листьев, мучнистые росы, ржавчины на листьях; в ней показаны наши достижения последних лет в создании усовершенствованных машин, по выявлению наиболее эффективных фунгисидов.

Биологический метод

Антагонистические взаимоотношения между различными членами микробного населения почвы давно привлекли к себе внимание микробиологов с точки зрения возможности использования этих взаимоотношений в борьбе с почвенными грибами, вызывающими массовые заболевания сельскохозяйственных растений. В Советской России первая попытка использовать явления антагонизма между микроорганизмами для борьбы с такими заболеваниями была сделана Худяковым (1935), который вносил в почву культуры бактерий, лизирующих Fusarium graminearum и Fusarium lini, вызывающих фузариоз льна и пшеницы. Попытка эта, проведенная на малых делянках, дала положительные результаты. Проблеме о взаимоотношениях микробов в почве посвящена очень содержательная статья Новогрудского (1936), снабженная значительной библиографией.

Учитывая громоздкость метода внесения бактерий в почву в полевых условиях на больших площадях, Березова использовала метод, который обычно применяется при внесении в почву бактериальных удобрений,— бактеризацию семян. В опыте были использованы штаммы миколитических бактерий, производящих лизис наиболее вредоносных для льна грибов: Fusarium lini, F. sterilis, Colletotrichum.

Результаты опыта показали, что по сравнению с химическим методом протравливания семян метод бактеризации дал лучшие результаты, чем протравливание стандартным препаратом ПД, и несколько уступает гранозану. Метод бактеризации особенно интересен тем, что защитное влияние бактерий сохраняется в течение всего вегетационного периода. Обнадеживающие результаты дали и опыты Наумовой по миколитическому действию ряда бактерий на пораженность всходов пшеницы грибами видов Fusarium и Altennaria. Последующие опыты Березовой и Наумовой выявили, что корни растений различных семейств и родов в пределах одного семейства несут на себе неодинаковое число таких бактерий, что, например, на корнях бобовых их больше, чем на корнях злаков. Учитывая результаты этих опытов, того, что сделано в данном направлении за рубежом, и большую ценность материала, который должен выращиваться в питомниках, надо считать крайне желательным развертывание научно-исследовательских работ по использованию антагонистических взаимоотношений с целью снизить роль таких заболеваний, как выпревание и полегание сеянцев, могущих вызвать их гибель в несметном числе.

По предварительным данным, полученным Красильниковым (1941), смешение перед посевом семян миколитических бактерий с семенами сосны дает положительные результаты в борьбе с фузариозом сеянцев сосны (вегетационные и деляночные опыты).

Выводы из статьи Красильникова и Разницыной (1946) говорят о снижении некоторыми штаммами бактерий заболевания и гибели сеянцев от фузариума на 70—90%.

Лабораторные, вегетационные и полевые опыты авторов установили, что некоторые бактерии-антагонисты не только подавляют развитие

грибка, но и обладают способностью ускорять прорастание семян и рост всходов, являются хорошими активаторами. Из бактеризированных компостов, обладающих способностью активировать развитие растения и угнетать рост грибов, наилучший эффект по снижению фузариоза сеянцев сосны дал компост житняка. Все это говорит о перспективности применения метода бактеризации в деле предупреждения массовых заболеваний сеянцев древесных и кустарниковых растений.

Встал и другой, более широкого диапазона, вопрос о взаимодействии микроорганизмов почвы с растением, вопрос большого теоретического и практического значения, хорошо освещенный в статьях Красильникова 1941 и 1949 г. Если велико практическое решение этих вопросов в полеводстве, тем больше его значение в области лесоводства, в частности в отношении выращивания сеянцев и саженцев.

Заключение

Беглый обзор отечественной литературы по грибным заболеваниям сеянцев и саженцев показывает, что в этой области размах обследовательской и научно-исследовательской работы и внимание к ряду практических задач совершенно недостаточны для решения этой проблемы в наши дни, когда ставится грандиозная задача по насаждению лесных полос в лесостепи и засушливой степи. Совершенно не ясно, как поведут себя возбудители отдельных заболеваний, какие из заболеваний могут принять массовый характер в новых почвенных климатических условиях, резко отличных от условий исконных лесных районов. Достаточно хорошо изучены грибные заболевания сеянцев сосны, слабо изученными остаются болезни дуба, ильмовых, ясеней и ряда других пород, которые предполагается использовать на юге. Если на севере не могли иметь широкого распространения возбудители болезней, споры которых прорастают при высоких температурах,— в степи они найдут для себя особо благоприятные условия. Если на севере преградой для разноса ветром спор служили леса, перенос их на далекие расстояния в открытой степи хорошо обеспечен. Несомненно, что на светло- и темнокаштановых почвах юга, слабо и сильно засоленных, флора грибов и их антагонистов — бактерий будет резко отличной от флоры лесных областей.

Итак, ставится задача ближайших дней — выявить в лесостепи и степи болезни наибольшего хозяйственного значения, ареалы, очаги их, факторы, могущие способствовать возникновению эпифитий.

Обзор литературы приводит к заключению, что в научно-исследовательской работе по изучению болезней господствующим являлось описательное направление, а не эксперимент в широких производственных условиях. Основное внимание уделялось морфологии, систематике грибов; недостаточно внимания — больному растению, болезненному процессу, интенсивности его в зависимости от окружающих условий, неорганических и органических. Много сделано в области изучения и испытания фунгисидов, в области конструирования машин для протравливания, опрыскивания, дезинфекции почвы; слишком недостаточно сделано в отношении селекции форм, если не иммунных, то устойчивых к важнейшим заболеваниям. Проделана большая работа в отношении выявления и создания сортов полевых, огородных культур, плодовых деревьев, устойчивых к наиболее вредоносным грибам, почти не начата работа над выведением форм древесных пород, слабо поражаемых инфекционными заболеваниями. Стоит вдуматься в результаты работ по созданию форм ильмовых, устойчивых к голландской болезни, чтобы представить себе, какие возможности таятся в решении этой проблемы при том исключительном разнообразии форм, рас климатических, эдафических, которыми так богата наша необъятная Родина.

Получено 15.IV.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Бараней А. В. Сердцевинная гниль корней у дубовых сеянцев и саженцев. Научный отчет за 1939 год. Укр. Научно-иссл. инст. агро-лесомелиорации. 1940.
2. Березова Е. Ф. Бактеризация семян как метод борьбы с болезнями льна. Микробиология, VIII, вып. 2, 1939.
3. Березова Е. Ф. и Наумова А. Н. Миколитические бактерии в корневой системе растений. Микробиология, VIII, вып. 6, 1939.
4. Ванин С. И. Болезни сеянцев и семян лесных пород. Сельхозгиз, 1931.
5. Ванин С. И. Лесная фитопатология. Гос. лесотехн. изд-во, 1948.
6. Власов А. А. Борьба с увяданием и полеганием сеянцев путем протравливания почвы серной кислотой. В защиту леса, № 4, 1938.
7. Горшин С. Н. Новые фунгисиды для борьбы с шютте. В защиту леса, № 3, 1938.
8. Гуляев В. В. Повреждение почек сосновых сеянцев в питомниках Татреспублики. Сборник по лесному хозяйству и лесокультуре, вып. IV, Казань, 1939.
9. Гуляев В. В. Таблицы для определения важнейших заболеваний сосновых сеянцев. Сборник статей по лесному хозяйству, вып. V, Казань, 1940.
10. Гуляев В. В. Болезни сеянцев сосны в лесных питомниках Татарской АССР, Казань, 1948.
11. Гуляев В. В. Условия, благоприятствующие проявлению грибных заболеваний в питомниках сосны. Тр. по лесному хозяйству, вып. IX, Казань, 1948.
12. Гуляев В. В. Как предохранить питомники сосны от шютте. Тр. по лесному хозяйству, вып. IX, Казань, 1948.
13. Гуляев В. В. Выпревание сеянцев сосны в лесных питомниках. Тр. по лесному хозяйству, вып. IX, Казань, 1948.
14. Дудина В. С. Голландская болезнь ильмовых пород. Сельхозгиз, 1938.
15. Дудина В. С. Заболевание сосны, вызываемое грибом Cenangium abietis. Лесное хозяйство, № 10, 1939.
16. Дунин М. С. и Гольдмахер Н. С. О некоторых эпидемических заболеваниях молодых растений в лесных питомниках, Лесовод, № 5, Москва, 1926.
17. Журавлев И. И. Практические указания по дезинфекции лесных семян и почвы. Центр. научно-иссл. ин-т лесного хоз., Ленинград, 1947.
18. Журавлев И. И. и Соколов Д. В. Грибные болезни семян древесных и кустарниковых пород. Ленинград, 1947.
19. Захаров П. С., Потапов К. Г., Вилков П. П. Голландская болезнь ильмовых и борьба с ней. Лесное хозяйство, № 4, 1939.
20. Карпова-Бенуа Е. И. Полегание сеянцев хвойных пород в лесных питомниках и борьба с этими заболеваниями, 1934.
21. Красильников Н. А. О взаимодействии микроорганизмов почвы с растениями. Природа, № 3, 1941.
22. Красильников Н. А. и Разницина Г. А. Борьба с фузариозом сеянцев сосны. Агробиология. № 5—6, 120, 1946.
22а. Красильников Н. А. Микроорганизмы почвы и урожайность растений. Агробиология, № 2, 1949.
23. Назарова Е. Болезнь сосен, вызываемая Sclerophoma pithyophila v. H. Изв. АН СССР, отд. биол. наук, № 6, 1936
24 Наумова А. Н. Влияние бактеризации семян на пораженность всходов яров. пшеницы грибными паразитами и на ее урожай. Микробиология, VIII, вып. 2, 1939.
25 Нестерчук Г. Н. Леса Карело-Мурманского края и их вредители. Болезни растений, № 3—4, 1930.
26. Новогрудский Д. М. Антагонистические взаимоотношения у микробов и биологические методы борьбы с грибковыми заболеваниями культурных растений Успехи совр. биол., V, вып. 3, 1936.
27 Самофал С. А. Естественное возобновление и опытные культуры в борах Украины. Тр. по лесному опытному делу Украины, вып. II, 1925.
28 Трошанин П. Г. Сосновый вертун и его влияние на рост и формирование стволов сосны. Казань, 1938.
29. Трошанин П. Г. и Гуляев В. В. Опытные посадки сосны сеянцами, поврежденными шютте. Лесное хозяйство, № 3, 1940.
30. Трусова Н. П. Наиболее распространенные болезни сеянцев и питомников лесхозов водоохранной зоны в 1938 году. Тр. Всес. науч.-иссл. ин-та лесн. хоз., Лесоохранение, вып. 9, 1939.
31. Турский М. Заболевание сосны в питомниках. Лесной журнал, вып. 3, 1893.
32. Худяков Я. П. Литическое действие почвенных бактерий на паразитические грибы. Микробиология, VIII, вып. 2, 1939.
33. Черкашина Н. И. Полегание сеянцев лиственных пород. Научный отчет за 1939 г. Укр. научно-исслед. ин-т агро-лесомелиорации, Харьков, 1940.
34. Щербин-Парфененко А. А. Голландская болезнь и меры борьбы с ней. В защиту леса, № 5, 1938.
35. Haack. Der Schüttepilz der Kiefer. Z. Forst und Jagdwesen, S. 302, 402, 481, Berlin, 1911.
36. Hartley C. Damping-off in forest nursiers. U. S. Dept. Agr. Bull., 934, 1921.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Fales F. W. and Baumberger J. P. **The anaerobic assimilation of glucose by yeast cells.** (Анаэробное усвоение глюкозы дрожжевыми клетками). J. Biol. Chem., v. 173, No 1, pp. 1—8, 1948.

Поскольку в литературе долгое время господствовало убеждение, что дрожжевые клетки способны к синтезу полисахаридов только в присутствии молекулярного кислорода, и поскольку в последние годы стали появляться данные, противоречащие подобной точке зрения,— авторы предприняли работу по выяснению этого вопроса.

Опыты проводились с Saccharomyces cerevisiae в анаэробных (азот) условиях в течение 3,5 часа. Субстратом служила безводная *d*-глюкоза. Определялись: углекислый газ и редуцирующие вещества: а) в суспензии клеток, б) в центрифугате и в) в клетках после гидролиза соляной кислотой. Разность [в — (а — б)] принималась за сумму гидролизуемых полисахаридов.

Авторами было установлено, что при сбраживании прессованными дрожжами глюкозы — 20% добавленной глюкозы синтезируется в полисахарид, 70% распадается до углекислоты и спирта и остальные 10% переходят в промежуточные продукты. Дрожжи, лишившиеся запасов углерода в результате 6-дневного голодания в условиях усиленной аэрации, дают те же соотношения, с той лишь разницей, что синтез полисахаридов завершается быстрее.

В начальной стадии брожения имеет место накопление промежуточных продуктов (до 40% добавленного сахара).

Так как выделение тепла в процессе брожения, измеренное в специально поставленном опыте, идет параллельно образованию углекислоты, авторы считают, что это накопление промежуточных продуктов не сопровождается сколько-нибудь значительным теплообразованием. В конечном итоге авторы приходят к выводу, что имеющиеся в литературе данные о приблизительно количественном переводе добавленного сахара в продукты брожения объясняются чрезмерной длительностью опытов, благодаря чему после полного исчезновения субстрата в процесс вовлекается синтезированный полисахарид.

Т. Борисова и Е. Грищенко

Karim A. **Microbiological decomposition of water hyacinth.** (Микробиологическое разрушение водного гиацинта). Soil Science, v. 66, No. 6, pp. 401—417, 1948.

Водный гиацинт (Eichhornia crassipes) представляет собой бедствие бенгальских низменностей. В связи с этим встал вопрос об использовании водного гиацинта в качестве удобрения бедных азотом почв Индии и Пакистана. Водный гиацинт имеет следующий состав: целлюлозы 40%, лигнина 16%, протеинов 10,7%, жиров и восков 1,9%, фурфурола 7,7%.

Навески водного гиацинта подвергались микробиологическому разрушению в аэробных и анаэробных условиях. Материалом для заражения служила суспензия из навоза. В анаэробных условиях процесс шел очень медленно. В аэробных условиях за 90 дней разрушалось 50% водного гиацинта. Добавление различных источников азота (лучше всего $NaNO_3$, затем NH_4NO_3 и $(NH_4)_2SO_4$) ускоряло процесс разрушения, но весьма незначительно, так что можно сказать, что для микроорганизмов вполне было достаточно азота самого растения. Наиболее интенсивно процесс протекал в первые 15 дней. Наибольшему разрушению подвергается целлюлоза — до 70%, фурфурол также интенсивно разрушается. Лигнин более устойчив — разрушение достигает 10—23%. По своему химическому составу разрушенный водный гиацинт сходен с конским навозом. Исследовалось влияние добавления водного гиацинта на размножение микроорганизмов в почве. Показано, что размножение бактерий и грибов в почвах с водным гиацинтом происходит значительно быстрее, чем в почвах без добавления гиацинта. Накопления азотобактера не наблюдалось. Азотфиксации не обнаружено. Отмечено в почвах с гиацинтом увеличение аммиачного азота. Таким образом, водный гиацинт может быть использован в качестве азотистого удобрения.

Л. Оснищкая

Brickson W. L., Henderson L. M., Solhjell I. and Elvehjem C. A. **Antagonism of amino acids in the growth of lactic acid bacteria.** (Антагонизм аминокислот в процессе роста молочнокислых бактерий). J. Biol. Chem., v. 176, No. 2, pp. 517—529, 1948.

Авторы исследовали взаимный антагонизм различных аминокислот в процессе роста Lactobacillus arabinosus и Leuconostoc mesenterioides.

Равные (определение в колориметре Evelin) концентрации посевного материала этих культур вносились в стерильную среду, в которую добавлялись различные концентрации тех или иных аминокислот. Через 60—72 часа в среде определялось содержание молочной кислоты электрометрическим титрованием 0,04 *N* NaOH.

При этом было выяснено, что метаболизм Lactobacillus arabinosus угнетается равными концентрациями лейцина, изолейцина, валина и метионина, прибавленными к среде. Добавление высоких (0,2—0,4 мг на 2 см³ среды) концентраций лейцина, валина и метионина вызывает подавление роста культуры на среде с изолейцином. Аланин, треонин и серин не вызывают подавления роста даже в больших концентрациях. Изолейцин сильнее, чем валин подавляет рост на лейцине.

Leuconostoc mesenterioides более устойчив к угнетающему действию аминокислот для подавления его роста требуются в 5 раз большие концентрации, чем для L. arabinosus.

Л. Осницкая

Raistrick H. and Vincent Y. **Studies in the biochemistry of microorganisms. 77. A survey of fungal metabolism of inorganic sulphates.** (Исследования по биохимии микроорганизмов 77. Исследования превращения неорганических сульфатов грибами). Biochem. J., v. 43, No. 1, pp. 90—96, 1948.

Биохимическое превращение серы было изучено у 115 видов грибов в условиях выращивания их при температуре 24° в течение разных промежутков времени на среде Чапек-Докс с глюкозой и Mg- и Fe-сульфатами в качестве единственных источников серы.

Подробно описаны методы, применявшиеся для определения различных форм серы в фильтрате и в пленке.

Все исследованные грибы хорошо усваивали неорганические сульфаты, а два вида использовали до 90% сульфатов. В процессе использования неорганических сульфатов грибами в среде было обнаружено значительное количество сернистых соединений в лабильной форме (возможно в виде эфирных сульфатов), переходящих в неорганические сульфаты уже при слабом гидролизе, и более устойчивых сернистых соединений,— типа протеинов или пептонов.

В мицелии было найдено 0,22—0,25% серы.

Л. Осницкая

Horn M. J., Breese J. D. and Blum A. E. **Microbiological determination of phenylalanine in proteins and foods.** (Микробиологическое определение фенилаланина в протеинах и пищевых продуктах). J. Biol. Chem., v. 176, No. 2, pp. 679—685, 1948.

Химические методы определения фенилаланина в смеси с различными аминокислотами заключают в себе ряд специфических затруднений. С помощью культуры Leuconostoc mesenteroides фенилаланин довольно легко определяется как в смеси различных протеинов, так и в пищевых продуктах. Культура L. mesenteroides выращивается на минеральной среде с глюкозой, биотином и 20-ю различными аминокислотами, в том числе — с фенилаланином. Образующаяся при этом молочная кислота оттитровывается 0,1 *N* NaOH. Содержание фенилаланина определяется пересчетом по кривой, где по оси абсцисс отложены см³ 0,1 *N* NaOH, пошедшие на титрование молочной кислоты, образовавшейся в сравнимых условиях из заранее определенных стандартных растворов фенилаланина, концентрация которого отложена на оси ординат. Результаты метода проверены на 31 протеине и пищевых продуктах и находятся в соответствии с данными, полученными другими методами.

Л. Осницкая

Geoghegan M. and Brian R. **Aggregate formation in soil. I. Influence of some bacterial polysaccharides on the bindinig of soil particles.** (Образование агрегатов в почве. I. Влияние некоторых бактериальных полисахаридов на связывание почвенных частиц). Biochem. J., v. 43, No. 1, pp. 5—14, 1948.

Leuconostoc dextranicum, Leuconostoc mesenteroides, а также выделенный из почвы Bacillus subtilis при выращивании на минеральных средах с сахарозой при t = 27° за 8—10 дней образуют в качестве нормальных продуктов своей жизнедеятельности значительные количества полисахаридов — типа декстрана и левана. Извлеченные из среды и очищенные леван и декстран испытывались на способности создавать водно-устойчивые почвенные агрегаты. При этом оказалось, что эти вещества производят сильное связывающее действие на почвенные частички. Установлена зависимость между количеством образовавшегося левана, его агрегирующим эффектом и концентрацией сахарозы в среде. Почвенные частицы, содержащие незначительные количества левана,

очень устойчивы к воздействию повышенной температуры, воды и механических факторов, но быстро разрушаются от действия микроорганизмов. Таким образом продукты жизнедеятельности микроорганизмов могут оказывать влияние на почвенную структуру.

Л. Осницкая

Schultz A. S. and Pomper S. **Amino acids as nitrogen source for the growth of yeasts.** (Аминокислоты как источник азота для роста дрожжей). Arch. Biochem., v. 19, No. 2, pp. 184—193. 1948.

Были проведены исследования способности дрожжей, принадлежащих к различным родам, использовать азот индивидуальных аминокислот. В калибрированные для абсорбционных целей пробирки наливалось 3 см³ среды (раствор сахара и солей), 3 см³ раствора витаминов и 3,5 см³ раствора одного из источников азота и вносилось 0,07 мг дрожжей. Культивирование производилось при 30° со встряхиванием культуры. Измерение роста производилось через 16, 20, 24 и 40 часов в колориметре Lumerton. Установлено, что хотя дрожжи рода Saccharomyces развиваются на аминокислотах слабее, чем на казеине или $(NH_4)_2SO_4$, но на аланине, аргинине, аспарагине, аспарагиновой кислоте, глютаминовой кислоте и валине они дают хороший рост. Цистин, гистидин, глютамин, лизин и треонин не могут служить источниками азота для дрожжей рода Saccharomyces.

Torula dattila и Torula stellata весьма избирательно относятся к аминокислотам, а два вида Candida хорошо растут почти на всех индивидуальных аминокислотах. Представители Hansenula слабо растут на цистине, гистидине, лизине и треонине. Различная способность дрожжей использовать те или иные аминокислоты может зависеть как от структуры аминокислоты, а следовательно легкости процесса дезаминации, так и от различий в энзиматической системе дрожжей.

Л. Осницкая

Bird M. L., Challenger F., Charlton P. T. and Smith J. O. **Studies on the biological methylation. I. The action of moulds on inorganic and organic compounds of arsenic.** (Исследование по биологическому метилированию. I. Действие плесневых грибов на неорганические и органические соединения мышьяка). Biochem. J. v. 43, No. 1, pp. 78—84, 1948.

Изучалось отношение некоторых плесневых грибов к различным соединениям мышьяка. Очищенные мышьяковистые соединения добавлялись в концентрации 0,2—0,3% к среде Чапек-Докс или к хлебу, на которых выращивались культуры при комнатной температуре. Летучие продукты собирались в раствор $HgCl_2$.

Оказалось, что Scopulariopsis brevicaulis превращает мышьяковистые и метилмышьяковистые кислоты в триметиларсин, а алкилмышьяковистые кислоты в алкилдиметиларсин.

Penicillium notatum, Penicillium notatum sp., Penicillium chrysogenum и 2 вида Aspergillus niger хотя и инертны к мышьяковистой кислоте, но метилируют алкилмышьяковистые кислоты. Aspergillus glaucus превращает мышьяковистую и метилмышьяковистую кислоты в триметиларсин. Таким образом, установлено, что исследованные плесневые грибы способны проводить реакцию метилирования.

Л. Осницкая

СОДЕРЖАНИЕ

К. И. Рудаков. Учение Вильямса и задачи сельскохозяйственной микробиологии 289
М. В. Федоров. Фиксация молекулярного азота азотобактером в присутствии поверхностно-активных и водоотнимающих веществ 299
Н. Б. Нечаева. Два вида микобактерий, окисляющих метан 310
Н. А. Красильников. Роль микроорганизмов в выветривании горных пород. 1. Микрофлора поверхностного слоя скальных пород 318
А. А. Имшенецкий. Оптимальные питательные среды для десульфурирующих бактерий 324
А. Е. Крисс и Е. А. Рукина. О происхождении сероводорода в Черном море 332
М. И. Бондаренко-Зозулина. Строение молодых клеток неспоронос-ных бактерий 346
С. А. Коновалов. Избирательная способность дрожжей к потреблению азота различных аминокислот 351
Е. Т. Дикасова. Исследование грены тутового шелкопряда, полученной от зараженных желтухой бабочек 356
Е. С. Залманзон. Действие протеаз на ядерные включения при желтухе тутового шелкопряда 361
Б. В. Озимов. Простой тип нефелометра для определения мутности в пробирках 366
Л. И. Комарова. Пипетка для выделения культур из одной клетки . . . 370
Д. М. Новогрудский. Микоризы и степное лесоразведение (Обзор) . . . 372
И. Г. Бейлин. Грибные болезни сеянцев и саженцев (Обзор) 377
Рефераты 390

А-06588 Подписано к печати 2.VII. 1949 г. Печ. л. 6½+2 вклейки
Уч.-изд. л. 9,9 Тираж 4800 экз. Заказ 2293

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.